



***Caracterização Físico-Química, Morfológica e Influência da  
Reticulação em Suspensões Precursoras e Biofilmes de  
Gliadina***

ROSANE MICHELE DUARTE SOARES

Florianópolis

2008

ROSANE MICHELE DUARTE SOARES

***Caracterização Físico-Química, Morfológica e Influência da  
Reticulação em Suspensões Precursoras e Biofilmes de  
Gliadina***

Tese submetida ao Curso de Pós-Graduação em  
Química da Universidade Federal de Santa Catarina  
como parte dos requisitos para a obtenção do grau de  
Doutor em Química.

Área de concentração: Físico-Química.

Orientador: Prof. Dr. Valdir Soldi

Florianópolis

2008

## AGRADECIMENTOS

*A UFSC, seus professores e funcionários, por terem possibilitado minha formação acadêmica;*

*Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo suporte financeiro;*

*Ao Professor Dr. Valdir Soldi por sua confiança e incentivo constantes. E não menos importante, por sua paciência e amizade construída no decorrer destes anos;*

*À Dr. Patricia Rayas-Duarte pela possibilidade de intercâmbio, pela confiança e disposição sempre presentes;*

*Aos professores Dr. Alfredo Tibúrcio e Dr. Eduardo Pinheiro (in memorian), pelos constantes ensinamentos;*

*Aos queridos colegas, amigos e alguns ex-membros do POLIMAT: Adriana Santana, Alexandra, Aline Fernandes, Carol, Cláudia, Giovana, Luana, Ledilege, Larissa, Paula, Maria Alice, Marly Soldi, Jerusa, Rodrigo, Tiago e Vanderlei, pelos felizes anos de convívio, pelo respeito e por terem depositado em mim, mesmo sem saber, a incessante vontade de aprender;*

*À Gabriela Simon, que muito me ajudou na etapa final deste trabalho. Muito obrigada por seu auxílio e amizade;*

*Aos meus amigos: Alexandre Furtado, Aline Furuyama, Cris Camilo, Cris Helm, Cristina Escobar, Josiane Raguzzoni, Patrícia Albuquerque, Sandra Zanotto, Raquel Machado e Vênus Rais. Alguns perto, outros distantes geograficamente, mas todos muito especiais, amados e sempre lembrados. Obrigada pela amizade, pelos bons momentos e pela força nos momentos difíceis;*

*Aos meus pais Pedro e Odete, por me apoiarem incondicionalmente, entender a minha ausência e ainda assim, estarem sempre na torcida. A minha irmã Ana Camila, pela alegria em cada encontro e a minha sobrinha Rauana, por me mostrar como as coisas podem ser incrivelmente simples;*

*Ao Ricardo, pelos anos de companheirismo e amor: O essencial é invisível aos olhos;*

*E por fim, perdoem-me aqueles que possam ter sido esquecidos momentaneamente, a estes e aos demais acima citados, deixo minha sincera gratidão por toda contribuição direta ou indireta, mas fundamental na construção e término desta etapa.*

*Dedico este trabalho aos meus pais, Pedro e Odete, minha irmã Ana Camila, minha sobrinha Rauana e ao meu amado Ricardo: meus maiores tesouros, meu porto seguro.*



## SUMÁRIO

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS.....	iii
LISTA DE FIGURAS .....	v
LISTA DE TABELAS.....	x
RESUMO .....	xi
ABSTRACT .....	xii
<b>CAPÍTULO 1</b>	
<hr/>	
INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA DO TRABALHO .....	1
<b>CAPÍTULO 2</b>	
<hr/>	
OBJETIVOS .....	3
2.1 <i>Objetivo Geral</i> .....	3
2.2 <i>Objetivos Específicos</i> .....	3
<b>CAPÍTULO 3</b>	
<hr/>	
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	4
3.1 <i>Um Breve Histórico de Embalagens</i> .....	4
3.2 <i>Biofilmes</i> .....	5
3.3 <i>Produção de Biofilmes a partir de Proteínas</i> .....	13
3.3.1 <i>Proteínas</i> .....	13
3.3.2 <i>Glúten</i> .....	15
3.3.3 <i>Gliadina</i> .....	18
<b>CAPÍTULO 4</b>	
<hr/>	
COMPORTAMENTO DE SUSPENSÕES DE GLIADINA NATIVA E RETICULADA ATRAVÉS DA TÉCNICA DE ESPALHAMENTO DE RAIOS X A BAIXOS ÂNGULOS (SAXS).....	23
4.1 <i>Resumo</i> .....	23
4.2 <i>Procedimento Experimental</i> .....	23
4.2.1 <i>Materiais</i> .....	23
4.2.2 <i>Preparo das suspensões de proteína</i> .....	24
4.2.3 <i>Análise de espalhamento de raios X a baixos ângulos (SAXS)</i> .....	24
4.3 <i>Resultados e Discussão</i> .....	25
4.4 <i>Conclusões Parciais</i> .....	40
<b>CAPÍTULO 5</b>	
<hr/>	
PROPRIEDADES VISCOELÁSTICAS DE SUSPENSÕES DE GLIADINA: EFEITO DA ADIÇÃO DE GLICEROL COMO PLASTIFICANTE E DOS PROMOTORES DE RETICULAÇÃO L-CISTEÍNA E HIDROCLORETO DE 1-(3-DIMETILAMINO PROPIL-3-ETIL-CARBODIIMIDA)/N- HYDROXISUCCINAMIDA [EDC/NHS] .....	41
5.1 <i>Resumo</i> .....	41
5.2 <i>Procedimento Experimental</i> .....	41

5.2.1 Material .....	41
5.2.2 Reologia .....	42
5.2.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) .....	43
5.2.4 Grau de reticulação (% R) .....	44
5.3 Resultados e Discussão .....	45
5.4 Conclusões Parciais .....	74
<b>CAPÍTULO 6</b>	
<b>PROPRIEDADES TÉRMICAS E ESPECTROSCÓPICAS DE FILMES DE GLIADINA RETICULADOS PELA ADIÇÃO DE HIDROCLORETO DE 1-(3-DIMETILAMINOPROPIL-3-ETIL- CARBODIIMIDA)/N-HIDROXISUCCINAMIDA E L-CISTEÍNA .....</b>	<b>77</b>
6.1 Resumo .....	77
6.2 Procedimento Experimental .....	77
6.2.1 Material .....	77
6.2.2 Preparo dos Filmes .....	77
6.2.3 Calorimetria Diferencial Exploratória [DSC] .....	78
6.2.4 Termogravimetria [TG] .....	78
6.2.5 Espectroscopia no Infravermelho [FTIR] .....	79
6.3 Resultados e Discussão .....	79
6.4 Conclusões Parciais .....	98
<b>CAPÍTULO 7</b>	
<b>PROPRIEDADES MECÂNICAS, INTUMESCIMENTO E SOLUBILIDADE, MORFOLOGIA E ISOTERMAS DE ADSORÇÃO DE FILMES COMPOSTOS POR GLIADINA, GLIADINA/[EDC/NHS] E GLIADINA/L-CISTEÍNA .....</b>	<b>100</b>
7.1 Resumo .....	100
7.2 Procedimento Experimental .....	100
7.2.1 Material .....	100
7.2.2 Preparo dos Filmes .....	100
7.2.3 Ensaios Mecânicos .....	101
7.2.4 Grau de intumescimento (GI) e solubilidade em água (SI) .....	101
7.2.5 Absorção de água .....	102
7.2.6 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) .....	103
7.3 Resultados e Discussão .....	103
7.3.1 Ensaios Mecânicos .....	103
7.3.2 Grau de Intumescimento (GI) e solubilidade em água (SI) .....	108
7.3.3 Morfologia .....	110
7.3.4 Isotermas de Adsorção .....	116
7.4 Conclusões Parciais .....	122
<b>CAPÍTULO 8</b>	
<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>124</b>
<b>CAPÍTULO 9</b>	
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>129</b>

## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

% E	porcentagem de alongação
% R	grau de reticulação
$\gamma$	taxa de cisalhamento
$\Delta G$	variação da energia livre de Gibbs
$\Delta H$	variação de entalpia
$\Delta S$	variação de entropia
ASTM	<i>American Standard Test Method</i>
BET	Brunauer-Emmet-Tellett
DMSO	dimetilsulfóxido
DSC	calorimetria diferencial exploratória
DTG	primeira derivada da curva termogravimétrica
EA	epóxi acrilato
UA	uretano acrilato
EDC	hidroclorato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etil-carbodiimida
FTIR	espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier
$G'$	módulo elástico ou de estocagem
$G'_{\text{máx}}$	módulo elástico máximo
$G''$	módulo viscoso ou de perda
GI	grau de intumescimento
HPMC	hidroxipropilmetilcelulose
<i>L</i> -cys	<i>L</i> -cisteína
MC	metilcelulose
MDSC	calorimetria exploratória diferencial modulada

MEV	microscopia eletrônica de varredura
$M_w$	massa molar ou massa molecular
NHS	N-hidroxisuccinamida
NR	não reticulado
PEG	polietilenoglicol
$R_c$	raio de giro da secção transversal
$R_g$	raio de giro
SAXS	espalhamento de raios X a baixos ângulos
SDS PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida
SI	índice de solubilidade
$T_g$	temperatura de transição vítrea
TG	termogravimetria
TGA	análise termogravimétrica
TNBS	2,4,6-trinitrobenzeno sulfônico
TS	tensão na ruptura
TSG	transição sol-gel
UR	umidade relativa
UV	radiação ultravioleta
WVP	permeabilidade ao vapor d'água

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 3

<b>Figura 3.1</b> - Biopolímeros para uso em filmes biodegradáveis e compósitos.....	6
<b>Figura 3.2</b> - Representação esquemática de uma rede polimérica. As ligações cruzadas estão representadas através dos círculos verdes e pelas intersecções entre as linhas.....	10
<b>Figura 3.3</b> - Representação esquemática das estruturas primária, secundária, terciária e quaternária de uma proteína.....	14
<b>Figura 3.4</b> - Representação esquemática do processo de desnaturação de uma proteína.....	15
<b>Figura 3.5</b> - Esquema ilustrativo para demonstração da fração gliadina e glutenina no glúten.....	19
<b>Figura 3.6</b> - Representação esquemática da estrutura tridimensional da gliadina.....	20

### CAPÍTULO 4

<b>Figura 4.1</b> - (A) Análise de Guinier para obtenção de $R_g$ e (B) secção transversal ( $R_c$ ) em suspensões de gliadina nas concentrações: (■)100, (○) 50 e (▲) 25 mg mL <sup>-1</sup> .....	26
<b>Figura 4.2</b> - $R_g$ (símbolos fechados) e $R_c$ (símbolos abertos) para suspensões de gliadina a diferentes concentrações com e sem a adição de plastificante.....	27
<b>Figura 4.3</b> - (A) Análise de Guinier para obtenção de $R_g$ e (B) e da secção transversal ( $R_c$ ) em suspensões de gliadina (100 mg mL <sup>-1</sup> ) reticuladas por [EDC/NHS] nas concentrações: (■)1.5 (♦) 3.0 (▲) 6.0 e (*)12 % (m/m de gliadina).....	28
<b>Figura 4.4</b> - $R_g$ (símbolos fechados) e $R_c$ (símbolos abertos) para suspensões de gliadina reticuladas por [EDC/NHS] (3,0 % , m/m de gliadina) a diferentes concentrações de proteína.....	30
<b>Figura 4.5</b> - (A) Análise de Guinier para obtenção de $R_g$ e (B) secção transversal ( $R_c$ ) em suspensões de gliadina (100 mg mL <sup>-1</sup> ) reticuladas por L-cisteína nas concentrações: (■) 0.5, (♦)1.5 e (▲) 3.0 % (m/m de gliadina).....	31
<b>Figura 4.6</b> - $R_g$ (símbolos fechados) e $R_c$ (símbolos abertos) para suspensões de gliadina reticuladas pela L-cisteína (1,5% m/m de gliadina) a diferentes concentrações de proteína com e sem a adição de glicerol.....	32
<b>Figura 4.7</b> - (A) Dependência do plastificante (B) e concentração de reticulante nos valores de $R_g$ (símbolos fechados) e $R_c$ (símbolos abertos) para as suspensões de gliadina (100 mg mL <sup>-1</sup> ).....	33
<b>Figura 4.8</b> - Análise de Kratky para suspensões de gliadina (100 mg mL <sup>-1</sup> ) a 25 °C: (A) sem glicerol e (B) com glicerol (15 % m/m de proteína).....	36
<b>Figura 4.9</b> - Análise de Kratky nas suspensões de gliadina (100 mg mL <sup>-1</sup> ) a 25 °C reticuladas com diferentes concentrações de L-cisteína.....	38

<b>Figura 4.10</b> - Análise de Kratky nas suspensões de gliadina (100 mg mL <sup>-1</sup> ) a 25 °C e reticuladas com diferentes quantidades de [EDC/NHS].....	39
---	----

## CAPÍTULO 5

<b>Figura 5.1</b> - Curvas de viscosidade em função da taxa de cisalhamento para suspensões de gliadina na ausência de glicerol. Sistema 1A: não reticulado; Sistema 1B: gliadina/[EDC/NHS] (3,0 % m/m de gliadina); Sistema C: gliadina/L-cisteína (1,5 % m/m de gliadina).....	45
--	----

<b>Figura 5.2</b> - Curvas de viscosidade em função da taxa de cisalhamento para suspensões de gliadina e glicerol (5 % m/m de gliadina). Sistema 1A: não reticulado; Sistema 1B: gliadina/glicerol/[EDC/NHS] (3,0 % m/m de gliadina); Sistema C: gliadina/glicerol/L-cisteína (1,5 % m/m de gliadina).....	46
---	----

<b>Figura 5.3</b> - Curvas de viscosidade em função da taxa de cisalhamento para suspensões de gliadina e glicerol (10 % m/m de gliadina). Sistema 1A: não reticulado; Sistema 1B: gliadina/glicerol/[EDC/NHS] (3,0 % m/m de gliadina); Sistema C: gliadina/glicerol/L-cisteína (1,5 % m/m de gliadina).....	47
--	----

<b>Figura 5.4</b> - Curvas de viscosidade em função da taxa de cisalhamento para suspensões de gliadina e glicerol (15 % m/m de gliadina). Sistema 1A: não reticulado; Sistema 1B: gliadina/glicerol/[EDC/NHS] (3,0 % m/m de gliadina); Sistema C: gliadina/glicerol/L-cisteína (1,5 % m/m de gliadina).....	48
--	----

<b>Figura 5.5</b> - Curvas de viscosidade em função da taxa de cisalhamento para suspensões de gliadina na presença de 20 % de glicerol (m/m de gliadina). Sistema 1A: suspensão de gliadina (100 mg mL <sup>-1</sup> )/glicerol; Sistema 1B: gliadina/glicerol/[EDC/NHS] (3,0 % m/m de gliadina); Sistema C: gliadina/glicerol/L-cisteína (1,5 % m/m de gliadina).....	49
---	----

<b>Figura 5.6</b> - Moles de grupos ε-Amino/g de gliadina (x10 <sup>-4</sup> ) em função do conteúdo de glicerol (% m/m de gliadina).....	50
---	----

<b>Figura 5.7</b> - Moles de grupos ε-Amino/g de gliadina (x10 <sup>-4</sup> ) em função do conteúdo de [EDC/NHS] (% m/m de gliadina).....	51
--	----

<b>Figura 5.8</b> - Grau de reticulação (R %) em função do conteúdo de [EDC/NHS] (% m/m de gliadina) na suspensão de gliadina/glicerol/[EDC/NHS].....	52
---	----

<b>Figura 5.9</b> - Eletroforegrama mostrando SDS-PAGE (12 %) na ausência (linhas 1, 2, 3, 4) e presença de agente redutor (linhas 5, 6, 7, 8) e com a adição de diferentes concentrações de L-cisteína (0,5; 1,5 e 3,0 % m/m de gliadina). St = padrão molecular.....	54
--	----

<b>Figura 5.10</b> - Dependência de G', G'' e tan δ em função do tempo para a suspensão de gliadina (100 mg mL <sup>-1</sup> ) não reticulada e na ausência de plastificante.....	56
---	----

<b>Figura 5.11</b> - Dependência de G', G'' e tan δ em função do tempo para a suspensão de gliadina (100 mg mL <sup>-1</sup> ) não reticulada e com adição de glicerol como plastificante (15 % m/m de gliadina).....	57
---	----

<b>Figura 5.12</b> - Dependência de G' em função do tempo para as suspensões de gliadina (100 mg mL <sup>-1</sup> ) reticuladas com diferentes concentrações de [EDC/NHS] e na ausência de plastificante. A concentração de reticulante aparece indicada na figura.....	59
---	----

<b>Figura 5.13</b> - Dependência de $G''$ em função do tempo para as suspensões de gliadina ( $100 \text{ mg mL}^{-1}$ ) reticuladas com diferentes concentrações de [EDC/NHS] e na ausência de plastificante.....	59
<b>Figura 5.14</b> - Dependência de $\tan \delta$ em função do tempo para as suspensões de gliadina ( $100 \text{ mg mL}^{-1}$ ) reticuladas com diferentes concentrações de [EDC/NHS] e na ausência de plastificante.....	60
<b>Figura 5.15</b> - Dependência de $G'$ em função do tempo para suspensões de gliadina ( $100 \text{ mg mL}^{-1}$ ) reticuladas com diferentes concentrações [EDC/NHS] e com adição de plastificante (15 % m/m).....	62
<b>Figura 5.16</b> - Dependência de $G''$ em função do tempo para suspensões de gliadina ( $100 \text{ mg mL}^{-1}$ ) reticuladas com diferentes concentrações [EDC/NHS] e com adição de plastificante (15 % m/m).....	63
<b>Figura 5.17</b> - Dependência de $\tan \delta$ em função do tempo para suspensões de gliadina ( $100 \text{ mg mL}^{-1}$ ) reticuladas com diferentes concentrações [EDC/NHS] e com adição de plastificante (15 % m/m).....	64
<b>Figura 5.18</b> - Dependência de $G'$ , $G''$ e $\tan \delta$ em função do tempo para suspensões de gliadina ( $100 \text{ mg mL}^{-1}$ ) reticuladas com L-cisteína (0,5 % m/m) e sem adição de plastificante.....	65
<b>Figura 5.19</b> - Dependência de $G'$ , $G''$ e $\tan \delta$ em função do tempo para suspensões de gliadina ( $100 \text{ mg mL}^{-1}$ ) reticuladas com L-cisteína (0,5 % m/m) e com adição de plastificante (15 % m/m).....	66
<b>Figura 5.20</b> - Dependência de $G'$ , $G''$ e $\tan \delta$ em função do tempo para suspensões de gliadina ( $100 \text{ mg mL}^{-1}$ ) reticuladas com L-cisteína (1,5 % m/m) e sem adição de plastificante.....	67
<b>Figura 5.21</b> - Dependência de $G'$ , $G''$ e $\tan \delta$ em função do tempo para suspensões de gliadina ( $100 \text{ mg mL}^{-1}$ ) reticuladas com L-cisteína (1,5 % m/m) e com adição de plastificante (15 % m/m).....	67
<b>Figura 5.22</b> - Dependência de $G'$ , $G''$ e $\tan \delta$ em função do tempo para suspensões de gliadina ( $100 \text{ mg mL}^{-1}$ ) reticuladas com L-cisteína (3,0 % m/m) e sem adição de plastificante.....	68
<b>Figura 5.23</b> - Dependência de $G'$ , $G''$ e $\tan \delta$ em função do tempo para suspensões de gliadina ( $100 \text{ mg mL}^{-1}$ ) reticuladas com L-cisteína (3,0 % m/m) e com adição de plastificante (15 % m/m).....	69
<b>Figura 5.24</b> - (a) Dependência de $dG'/dt$ em função do tempo a temperatura constante para as suspensões de gliadina ( $100 \text{ mg mL}^{-1}$ ) com diferentes concentrações de L-cisteína e na ausência de glicerol como plastificante. (b) Dependência de $dG'/dt$ em função do tempo a temperatura constante para as suspensões de gliadina ( $100 \text{ mg mL}^{-1}$ ) com diferentes concentrações de L-cisteína e adicionadas de glicerol (15 % m/m de gliadina).....	69
<b>Figura 5.25</b> - Valores de $G'$ máximos para as suspensões de gliadina ( $100 \text{ mg mL}^{-1}$ ) com diferentes concentrações de L-cisteína e na presença (a) e ausência (b) de glicerol como plastificante.....	72

## CAPÍTULO 6

<b>Figura 6.1</b> - Temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ) em função da concentração de glicerol (% m/m de gliadina) para filmes de gliadina não reticulados (Sistema A), reticulados com [EDC/NHS] (Sistema B) e reticulados com L-cisteína (Sistema C).....	79
<b>Figura 6.2</b> – Curvas termogravimétricas (A) e (B) DTG para os filmes de gliadina não reticulados e adicionados	

de diferentes concentrações de glicerol (1A (zero), 2A (5 % m/m), 3A (10 % m/m), 4A (15 % m/m) e 5A (20 % m/m)).....	81
<b>Figura 6.3</b> – Curvas termogravimétricas (A) e (B) DTG para os filmes de gliadina reticulados com [EDC/NHS] (3,0 % m/m de gliadina) e adicionados de diferentes concentrações de glicerol (1B (zero), 2B (5 % m/m), 3B (10 % m/m), 4B (15 % m/m) e 5B (20 % m/m)).....	82
<b>Figura 6.4</b> – Curvas termogravimétricas (A) e DTG (B) para os filmes de gliadina reticulados com L-cisteína (1,5 % m/m de gliadina) e adicionados de diferentes concentrações de glicerol (1C (zero), 2C (5 % m/m), 3C (10 % m/m), 4C (15 % m/m) e 5C (20 % m/m)).....	83
<b>Figura 6.5</b> – Espectros de infravermelho para os filmes de gliadina (A) não reticulados e sem aquecimento e (B) não reticulados e com aquecimento.....	86
<b>Figura 6.6</b> – Sobreposição dos espectros de infravermelho para os filmes de gliadina sem adição de glicerol, não aquecidos e aquecidos a 55 °C.....	87
<b>Figura 6.7</b> – Sobreposição dos espectros de infravermelho para os filmes de gliadina/glicerol (15 % m/m de gliadina), não aquecidos e aquecidos a 55 °C.....	88
<b>Figura 6.8</b> – Espectro na região do infravermelho para os filmes de gliadina reticulados com [EDC/NHS] (3,0 % m/m de gliadina) a diferentes concentrações de glicerol: 1B (zero); 2B (5 % m/m); 3B (10 % m/m); 4B (15 % m/m) e 5B (20 % m/m).....	89
<b>Figura 6.9</b> – Sobreposição dos espectros na região do infravermelho (1750 a 1450 $\text{cm}^{-1}$ ) para os filmes de gliadina reticulados com [EDC/NHS] (3,0 % m/m de gliadina) a diferentes concentrações de glicerol: 1B (zero); 2B (5 % m/m); 3B (10 % m/m); 4B (15 % m/m) e 5B (20 % m/m).....	90
<b>Figura 6.10</b> – Sobreposição dos espectros na região do infravermelho (1750 a 1350 $\text{cm}^{-1}$ ) para (A) filmes de gliadina nativa e reticulados com [EDC/NHS] (3,0 % m/m de gliadina) e; (B) filmes de gliadina nativos e reticulados com [EDC/NHS] (3,0 % m/m de gliadina) e na presença de glicerol (15 % m/m de gliadina).....	91
<b>Figura 6.11</b> – Sobreposição dos espectros na região do infravermelho (1750 a 1450 $\text{cm}^{-1}$ ) para filmes de gliadina reticulados com diferentes concentrações de [EDC/NHS] e com glicerol (15 % m/m de gliadina).....	92
<b>Figura 6.12</b> – Espectro na região do infravermelho para os filmes de gliadina reticulados com L-cisteína (1,5 % m/m de gliadina) e a diferentes concentrações de glicerol: 1C (zero); 2C (5 % m/m); 3C (10 % m/m); 4C (15 % m/m) e 5C (20 % m/m).....	93
<b>Figura 6.13</b> - Sobreposição dos espectros na região do infravermelho (175- - 1450 $\text{cm}^{-1}$ ) para os filmes de gliadina reticulados com L-cisteína (1,5 % m/m de gliadina) e a diferentes concentrações de glicerol: 1C (zero); 2C (5 % m/m); 3C (10 % m/m); 4C (15 % m/m) e 5C (20 % m/m).....	94
<b>Figura 6.14</b> – Sobreposição dos espectros na região do infravermelho (1750 a 1350 $\text{cm}^{-1}$ ) para os filmes de gliadina não reticulados e reticulados com L-cisteína (1,5 % m/m de gliadina) na presença de diferentes concentrações de glicerol.....	96
<b>Figura 6.15</b> – Razão das intensidades na região das amidas I e II (1750 e 1540 $\text{cm}^{-1}$ , respectivamente) para os filmes não reticulados (Sistema A) e reticulados com L-cisteína (1,5 % m/m de gliadina) (Sistema C) em função	



da concentração de glicerol.....	97
----------------------------------	----

## CAPÍTULO 7

<b>Figura 7.1</b> – Curva de tensão versus deformação generalizada.....	101
<b>Figura 7.2</b> – Valores de tensão máxima observados para os filmes de gliadina não reticulados, filmes de gliadina/[EDC/NHS] e gliadina/L-cisteína, em função da concentração de glicerol adicionado, e a diferentes umidades relativas (%): (A) 23, (B) 46, (C) 77,3.....	104
<b>Figura 7.3</b> - Valores de deformação na ruptura observados para os filmes de gliadina não reticulados, filmes de gliadina/[EDC/NHS] e gliadina/L-cisteína, em função da concentração de glicerol adicionado, e a diferentes umidades relativas (%): (A) 23, (B) 46, (C) 77,3.....	106
<b>Figura 7.4</b> – Valores de módulo de Young observados para os filmes de gliadina não reticulados, filmes de gliadina/[EDC/NHS] e gliadina/L-cisteína, em função da concentração de glicerol adicionado, e a diferentes umidades relativas (%): (A) 23, (B) 46, (C) 77,3.....	107
<b>Figura 7.5</b> – Grau de solubilidade em água (%) para os filmes de gliadina nativos e reticulados em função de diferentes concentrações de plastificante.....	108
<b>Figura 7.6</b> – Grau de intumescimento em água para os filmes de gliadina nativos e reticulados em função de diferentes concentrações de plastificante.....	109
<b>Figura 7.7</b> – Microscopia eletrônica de varredura dos filmes obtidos a partir de suspensões de gliadina não reticulada com diferentes concentrações de glicerol.....	111
<b>Figura 7.8</b> – Microscopia eletrônica de varredura dos filmes obtidos a partir de suspensões de gliadina reticuladas com [EDC/NHS] (3,0 % m/m) a diferentes concentrações de glicerol.....	113
<b>Figura 7.9</b> - Microscopia eletrônica de varredura da superfície e secção transversal dos filmes obtidos a partir das suspensões de gliadina reticulada com L-cisteína (1,5 % m/m) a diferentes concentrações de glicerol.....	115
<b>Figura 7.10</b> – Valores experimentais e teóricos das isothermas de adsorção de umidade a 23 °C para: (A) filmes de gliadina nativos e reticulados em ausência de glicerol; (B) com 5 % de glicerol (m/m de gliadina); (C) 10 % de glicerol (m/m de gliadina); (D) 15 % de glicerol (m/m de gliadina); (E) 20 % de glicerol (m/m de gliadina).....	110
<b>Figura 7.11</b> – Conteúdo de água absorvida nos filmes de gliadina nativa, gliadina/[EDC/NHS] (3,0 % m/m) e gliadina e L-cisteína (1,5 % m/m) com diferentes concentrações de glicerol e diferentes umidades relativas (%): (A) 23; (B) 46 e (C) 77,3.....	120

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 3

---

<b>Tabela 3.1</b> - Polímeros comumente utilizados em embalagens.....	5
<b>Tabela 3.2</b> - Proteínas utilizadas na elaboração de filmes comestíveis, biodegradáveis e embalagens em geral.....	13
<b>Tabela 3.3</b> - Resumo dos principais trabalhos desenvolvidos com filmes de gliadina nos últimos anos.....	22

### CAPÍTULO 5

---

<b>Tabela 5.1</b> - Identificação dos sistemas submetidos aos ensaios no domínio não linear com a proporção de cada componente adicionado às suspensões de gliadina reticuladas e não reticuladas na presença e ausência de glicerol como plastificante.....	43
--	----

### CAPÍTULO 6

---

<b>Tabela 6.1</b> - Parâmetros termogravimétricos para os sistemas A (Não reticulado), B (gliadina/EDC/NHS/glicerol) e C (gliadina/cisteína/glicerol).....	84
--	----

### CAPÍTULO 7

---

<b>Tabela 7.1</b> - Parâmetros de BET e Oswin teóricos obtidos para os filmes de gliadina nativos, reticulados com [EDC/NHS] (3,0 % m/m de gliadina), L-cisteína (1,5 % m/m de gliadina) e com diferentes concentrações de glicerol.....	117
--	-----

Soares, Rosane Michele Duarte. **Caracterização Físico-Química, Morfológica e Influência da Reticulação em Suspensões Precursoras e Biofilmes de Gliadina**. Florianópolis, 2008. 153 p. Tese de Doutorado em Química – Programa de Pós Graduação em Química, Universidade Federal de Santa Catarina.

## RESUMO

No presente trabalho foram estudadas suspensões de gliadina não modificada (ou nativa) e reticuladas na ausência e presença de glicerol como plastificante. Para a reticulação foram utilizados hidrocloreto de 1-(3-dimetilaminopropil-3-etil-carbodiimida) e N-hidroxisuccinamida [EDC/NHS] e L-cisteína. A caracterização e comparação dos diferentes sistemas foram realizadas através da técnica de espalhamento de raios X a baixos ângulos (SAXS) a qual possibilitou a obtenção dos raios de giro ( $R_g$ ) e raio da secção transversal ( $R_c$ ) através da análise de Guinier. De maneira complementar, a análise de Kratky também foi empregada para a investigação das mudanças conformacionais da proteína. A fim de prosseguir a análise do comportamento em suspensão foram estudadas as propriedades viscoelásticas de suspensões de gliadina reticuladas e não reticuladas em presença e ausência de glicerol. Nos experimentos em domínio linear, foram obtidas curvas de viscosidade para os sistemas nativos e reticulados em função da concentração de glicerol como plastificante. Os experimentos oscilatórios permitiram a obtenção dos parâmetros  $G'$  (módulo de estocagem ou módulo elástico),  $G''$  (módulo de perda) e  $\tan \delta$  ( $G''/G'$ ). A variação de concentração tanto de L-cisteína quanto [EDC/NHS], perante ausência e presença de glicerol, permitiu considerar a influência do plastificante na velocidade de reticulação e a dependência do tempo para que a mesma ocorra. Para os filmes formados foram realizadas análises de caracterização por calorimetria diferencial exploratória (DSC), análise termogravimétrica (TG ou TGA) e espectroscopia na região do infravermelho (FTIR). Numa segunda etapa foram realizados ensaios mecânicos a diferentes umidades relativas para obtenção dos parâmetros: tensão máxima, deformação na ruptura e módulo elástico ou de Young serão analisados. Com o intuito de se observar mais criteriosamente como a água é absorvida nos filmes, isotermas de adsorção de umidade foram obtidas e, parâmetros matemáticos de ajuste tais como Oswin e BET foram empregados para comparação e adaptação aos dados experimentais obtidos. O presente estudo permitiu considerar as mudanças promovidas pelos agentes de reticulação, EDC/NHS, L-cisteína e ainda considerar a adição do plastificante no processo de aceleração de reticulação, o qual proporcionou mudanças não somente em suspensão, como também nos biofilmes de gliadina formados. A análise de espalhamento de raio X possibilitou o entendimento das prováveis conformações da gliadina mediante a adição de diferentes agentes de reticulação enquanto que experimentos reológicos viabilizaram o entendimento da proteína em suspensão e de que forma as estruturas previamente discutidas por SAXS puderam contribuir para o comportamento mais ou menos elástico e/ou viscoso. Os biofilmes formados e caracterizados apresentaram diferenças em suas propriedades no que se refere aos diferentes reticulantes, e ainda, quanto a presença e ausência de glicerol como plastificante.

Palavras-chave: biofilmes, gliadina, reticulação

## ABSTRACT

In the present work native and modified gliadin suspensions in the presence and absence of plasticizer were studied. Crosslinking reaction was employed using 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimidehydrochloride/n-hydroxysuccinimide [EDC/NHS] and *L*-cystein as chemical reagents. Characterization and comparison between different systems were carried out through small-angle X-ray scattering (SAXS) experiments where parameters as  $R_g$  (radius of gyration) and  $R_c$  (cross-section) were obtained by Guinier analysis. In addition, Kratky plot was also analyzed to investigate protein conformational changes. Prior to continue the investigation of viscoelastic suspension properties native and modified gliadin were analyzed under glycerol addition. The non-linear viscoelastic properties were also conducted and oscillatory experiments have showed storage ( $G'$ ), loss moduli ( $G''$ ) and  $\tan \delta$  ( $G''/G'$ ). Variation of *L*-cysteine and [EDC/NHS] under presence and absence of glycerol has showed the influence of the plasticizer on crosslinking and time dependence process. The obtained gliadin biofilms were characterized by differential scanning calorimetry (DSC), thermogravimetric analysis (TGA) and Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR). An attempted was made to relate the biofilms mechanical properties to different relative humidity (RH) and the investigation of water absorption mechanism was conducted by Oswin and BET parameters which were adjusted to experimental data. In addition, this study has allowed to consider the possible changes promoted by two different crosslinking reactions and also consider the influence of glycerol on this process. Plasticizer has showed to affect both suspension and film properties by different roles. The understanding of probable conformational changes by SAXS was fundamental to compare and relate the suspension behavior through rheological experiments. In conclusion, gliadin biofilms have showed different properties related to *L*-cysteine or [EDC/NHS] presence and the cross-linking process seems to be influenced by glycerol addition.

Key-words: biofilms, gliadin, crosslinking

### INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA DO TRABALHO

O interesse por materiais biodegradáveis e/ou biofilmes na área de alimentos, vem crescendo consideravelmente nas últimas décadas. O uso de biomateriais pode ser explicado tanto por aspectos ambientais e exigências dos consumidores, quanto pela necessidade de se criar fontes alternativas que forneçam valor agregado à matéria-prima final. Os biopolímeros, como alternativa, vêm trazendo não só bons resultados do ponto de vista científico, como vêm atendendo a diversas demandas do mercado atual.<sup>1,2</sup>

Muito provavelmente, a futura geração de embalagens será derivada de fontes renováveis e estes materiais serão por sua vez, biodegradáveis. Para que se atinja este objetivo, o contínuo avanço na formação, propriedades e aspectos econômicos de biofilmes devem ser considerados. Desta forma, para a escolha de determinada embalagem, fatores como pH, atividade de água e tempo de estocagem do alimento, devem ser criteriosamente considerados.<sup>3</sup>

Para a embalagem propriamente dita, alguns pré-requisitos são encontrados na literatura como sendo essenciais no recobrimento de alimentos, tais como: (a) permitir uma baixa, mas controlada respiração (reduzida absorção de O<sub>2</sub>) para comodidade dos alimentos; (b) permitir uma seletiva barreira a gases (CO<sub>2</sub>) e vapor d'água; (c) Criar uma atmosfera modificada, levando a extensão da vida útil dos alimentos; (d) servir como veículo para incorporação de aditivos (corantes, antioxidantes, agentes antimicrobianos); (e) prevenir ou reduzir a deterioração microbiana durante o período de estocagem.<sup>4</sup> Ou ainda, (f) não ser poluente; (g) Possuir suficiente estabilidade bioquímica, físico-química e microbiana; (h) apresentar tecnologia simplificada e baixo custo.<sup>5</sup> No entanto, todos estes fatores acima citados, têm em comum depender essencialmente da natureza do polímero (densidade, solubilidade, morfologia), natureza do fluido, área e espessura do filme, tempo de permeação e temperatura.<sup>6</sup>

Com o propósito de alcançar e melhorar todos os fatores acima citados, vêm sendo desenvolvidos ao longo das últimas décadas vários tipos de filmes, utilizando as mais diversas matérias-primas: polissacarídeos (amido, celulose, quitina, quitosana),<sup>7</sup> proteínas de origem vegetal (glúten, zeína do milho, soja), animal (gelatina, caseína e/ou caseinato, proteínas miofibrilares de peixe, proteínas da clara de ovos, queratina, dentre outras),<sup>8</sup> poliésteres,

poliamidas, poliuretanos e lipídios (cera de carnaúba, cera de abelha, triglicerídeos). Cabe ainda citar, as misturas de polímeros sintéticos já amplamente empregados, adicionados de polímeros naturais.<sup>9,10</sup>

Neste ínterim, as proteínas encontram-se dentre os polímeros amplamente distribuídos na natureza, onde desempenham inúmeras atividades biológicas, tanto em espécies de origem animal quanto vegetal. A escolha de determinada proteína na elaboração de biofilmes deve estar baseada em sua capacidade de otimizar as propriedades de barreira ao mesmo tempo em que aspectos de flexibilidade, resistência e solubilidade são alcançados. Filmes a base de proteína são freqüentemente quebradiços devido às interações entre as cadeias de proteínas compostas por ligações de hidrogênio, forças eletrostáticas, interações hidrofóbicas e/ou ligações (pontes) dissulfeto.<sup>8</sup> Neste caso, faz-se necessário a escolha de um plastificante adequado que possa reduzir a interação proteína-proteína melhorando concomitantemente a flexibilidade do filme.

De maneira adicional e complementar, a natureza hidrofílica de uma proteína, também pode ser modificada por uma série de tratamentos: aquecimento, reticulação enzimática, química ou irradiação ultravioleta. Esta modificação estrutural visa mudanças quanto à permeabilidade ao vapor d'água e atua também nas propriedades mecânicas e na solubilidade do filme. Portanto, a escolha de determinada proteína, plastificante e agente de reticulação irá delimitar não somente o estudo das propriedades físico-químicas do sistema e suas interações, como também direcionar o uso final deste filme para determinado uso, pois dependendo da temperatura de transição vítrea do sistema (delimita a processabilidade), propriedades mecânicas, propriedades de barreira,<sup>3</sup> umidade relativa do ambiente e ainda, das características do alimento, este poderá ser ou não incorporado ao sistema “proteína/plastificante/agente de reticulação”.

Com base nos parágrafos anteriores, o presente trabalho propõe a elaboração de biofilmes compostos por gliadina, utilizando como plastificante o glicerol, e ainda dois distintos agentes de reticulação hidrocloreto de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etil-carbodiimida [EDC/NHS] e *L*-cisteína, com potencial aplicação em sistemas alimentícios. O interesse neste sistema se dá pela possibilidade de colaborar com estudos na área de sistemas protéicos e/ou biopolímeros, pela contribuição na elucidação do comportamento deste sistema em suspensão, e por fim, no filme formado, cujas características são ainda pouco conhecidas e, podem permitir a possibilidade de transferência numa segunda etapa, da tecnologia obtida para a área de alimentos.

### OBJETIVOS

#### *2.1 Objetivo Geral*

Preparo e caracterização físico-química das suspensões formadoras e dos biofilmes formados a partir de gliadina, do plastificante glicerol e dos agentes de reticulação L-cisteína e hidrocloreto de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etil-carbodiimida/N-hidroxisuccinamida [EDC/NHS].

#### *2.2 Objetivos Específicos*

Avaliar as modificações estruturais da gliadina causadas pela concentração de plastificante e pela adição de diferentes agentes de reticulação em suspensões formadoras de biofilmes, através de espalhamento de raios X a baixos ângulos (SAXS);

Estudar a influência da variação da concentração de plastificante e de diferentes agentes de reticulação nas propriedades viscoelásticas das suspensões de gliadina, através de experimentos reológicos;

Caracterizar as propriedades térmicas e espectroscópicas dos biofilmes de gliadina, avaliando a influência da concentração de plastificante e o efeito da reticulação;

Determinar as propriedades mecânicas dos biofilmes de gliadina em função da quantidade de plastificante, do grau de reticulação e de diferentes umidades relativas de armazenamento;

Relacionar as características morfológicas dos biofilmes de gliadina com suas propriedades mecânicas, de intumescimento e de solubilidade;

Estudar as influências do plastificante e da reticulação sobre a forma de adsorção de umidade pelos biofilmes de gliadina, através das isothermas de adsorção de água ajustadas pelos modelos propostos por Oswin e BET.

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### *3.1 Um Breve Histórico de Embalagens*

Embora possa parecer recente, o recobrimento de alimentos visando sua conservação possui seus primeiros registros na China durante os séculos XII e XIII, quando a cera era aplicada em frutas cítricas. Nos Estados Unidos durante a década de 30, o uso da cera a base de parafina fundida tornou-se comercialmente disponível sendo utilizada no recobrimento de algumas frutas, como maçãs e pêras. Quando aplicada em alimentos, o uso da cera diminuía a permeação ao vapor d'água e a transmissão de oxigênio, reduzindo desta forma a taxa de respiração e aumentando a vida útil dos mesmos.<sup>11</sup>

Ao longo dos anos, inúmeras formas de preservar um alimento foram surgindo. A cera a base de parafina foi substituída por “recobrimentos com solvente”, ou seja, eram elaboradas com solventes derivados do petróleo aos quais resinas, plastificantes e outros reagentes eram adicionados. Já durante a década de 50, a cera de carnaúba foi introduzida no mercado, mas devido a sua aparência escura estas foram adicionadas de polietileno e parafina para a conservação de limões.<sup>11</sup> Segundo Debeaufort e colaboradores<sup>5</sup> a descoberta mais interessante desde a década de 30, foi uma emulsão elaborada com cera e óleo em água, a qual era espalhada sobre a superfície de frutas de modo a melhorar a aparência e cor e retardar a perda de água. Embora esta descoberta possa ter parecido muito interessante, atualmente a área de filmes comestíveis também tem instigado a curiosidade da comunidade científica que vem buscando matérias-primas diferenciadas que possam garantir qualidade dos alimentos e substituir gradativamente os materiais comumente utilizados (Tabela 3.1).



Tabela 3.1 – Polímeros comumente utilizados em embalagens<sup>4</sup>

<b>TIPO</b>	<b>UNIDADE MONOMÉRICA</b>	<b>CARACTERÍSTICAS</b>
Polietileno	Etileno	Propriedades mecânicas desejáveis
Polivinilideno	Vinilideno	Boa barreira para H <sub>2</sub> O e O <sub>2</sub>
Poliéster	Etilenoglicol + ácido tereftálico	Fraca barreira para H <sub>2</sub> O/O <sub>2</sub> , propriedades mecânicas desejáveis
Poliamida	Diamina + vários ácidos	Fraca barreira para H <sub>2</sub> O/O <sub>2</sub> , boa resistência
Celofane	Glicose (celulose)	Boa barreira para H <sub>2</sub> O/O <sub>2</sub> , boa resistência

Os diversos biopolímeros (caseína, celulose, zeína, proteína de soja, quitina, quitosana, amido, xantana, glúten) que vem sendo estudados atualmente, têm apresentado características desejáveis (geralmente não apresentam odor, sabor e são transparentes)<sup>2</sup> o que garante por si só que muitos estudos ainda serão realizados para que se possa contribuir cientificamente e tecnologicamente para a história da embalagem ao longo dos próximos anos.

### *3.2 Biofilmes*

Biofilmes e/ou filmes comestíveis podem ser produzidos a partir de polissacarídeos (amido, quitina, quitosana, celulose, alginato, pectina), proteínas (caseína, glúten, proteína de soja etc.), e outros biopolímeros (Figura 3.1). A escolha de determinado material dependerá das características desejadas e, do tipo de alimento que este irá recobrir. Para alguns alimentos, como gorduras poliinsaturadas que são sensíveis à oxidação, a baixa permeabilidade ao oxigênio é necessária. Já frutas e vegetais necessitam de respiração (O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, troca de etileno) mesmo enquanto estão estocados.<sup>5</sup>

Ainda neste contexto, um filme com excelentes propriedades de barreira pode ser ineficiente se suas propriedades mecânicas não garantirem sua integridade durante o manuseio, recobrimento e transporte. Portanto, fica implícito que não somente as propriedades de barreira (O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, etileno etc.), vapor d'água, aromas, luz, como também

fatores de processabilidade, propriedades mecânicas (resistência, alongação), migração/absorção e a resistência química são parâmetros a serem considerados criteriosamente.<sup>3</sup>

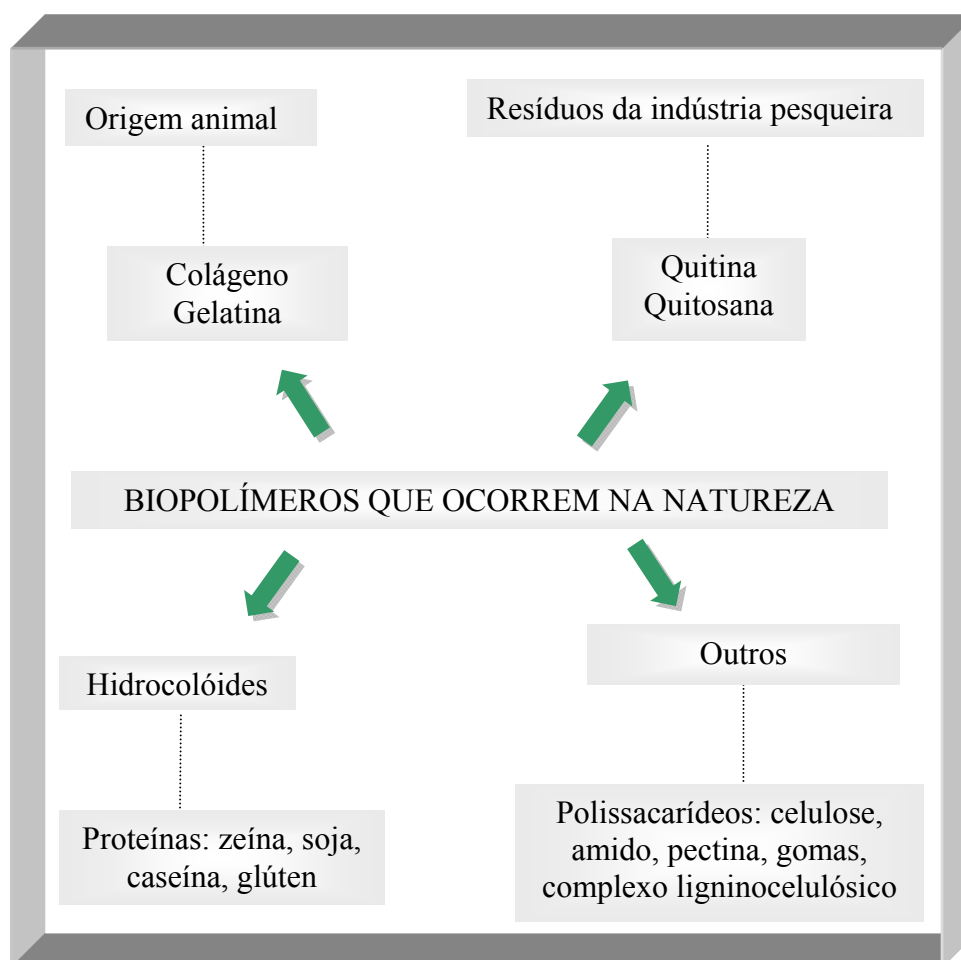


Figura 3.1 – Biopolímeros para uso em filmes biodegradáveis e compósitos.<sup>4</sup>

Em se tratando do processo de dissolução destes biomateriais, um ou mais polímeros naturais e/ou sintéticos podem ser misturados formando uma solução polimérica, a qual, posteriormente, dará origem ao biofilme. Alguns conceitos termodinâmicos estão envolvidos neste processo de dissolução, onde as interações entre os componentes irão depender da natureza de cada polímero e do solvente, massa molar do polímero, flexibilidade das cadeias poliméricas, empacotamento das macromoléculas, estrutura cristalina dos polímeros e temperatura estão entre as razões que podem afetar a solubilização do polímero.<sup>12,13</sup>

No entanto, apesar da influência de todos estes parâmetros, pode-se afirmar que o

processo de dissolução ocorre quando o polímero incha absorvendo moléculas do solvente de forma que aumente sua massa e volume. Nesta etapa, as moléculas do solvente lentamente se difundem através do polímero produzindo um gel. Caso a interação polímero-polímero seja alta devido à presença de ligações cruzadas, cristalinidade, ou ligações de hidrogênio, haverá a necessidade de que as interações polímero-solvente sejam mais fortes, favorecendo assim a desintegração do gel e a formação de uma solução verdadeira. Em outras palavras, a solubilidade de um polímero ocorre quando a energia livre da mistura ( $\Delta G_m$ ) é negativa.

$$\Delta G_m = \Delta H_m - T\Delta S_m \quad (1.1)$$

Ou seja, processos a pressão e temperatura constantes ocorrem espontaneamente na direção da diminuição da energia livre de Gibbs ou na direção da diminuição do potencial químico de cada componente. Desta forma, quanto maior for a energia livre da solução e a dos componentes, maior será a afinidade termodinâmica e mais perfeito será o processo de interação.<sup>13</sup>

Com relação aos biofilmes propriamente ditos, após serem devidamente solubilizados ou dissolvidos em um solvente, os mesmos podem ser aplicados diretamente na superfície de um alimento formando uma película, ou serem utilizados separadamente como um filme suporte. Algumas técnicas foram desenvolvidas para a formação dos mesmos e estão descritas nos itens abaixo:

(i) Coacervação: Envolve a separação do material polimérico da sua solução através de aquecimento, mudança de pH, adição de solventes, ou alterando a carga do polímero envolvido. Em uma coacervação simples, somente um polímero solúvel é envolvido. Quando complexa, pelo menos duas macromoléculas com cargas opostas são envolvidas no intuito de insolubilizá-las através do mecanismo de neutralização de cargas. Embora esta técnica seja muito empregada na indústria farmacêutica (encapsulação de fármacos), são encontradas poucas aplicações na indústria de alimentos, provavelmente devido aos custos de equipamentos e perda da qualidade do material encapsulado.

(ii) Remoção do solvente: É a técnica necessária para obtenção de filmes sólidos, neste caso a secagem se faz necessária e a taxa e a temperatura na qual esta ocorre influencia grandemente nas propriedades finais do filme.

Quanto à maneira de serem aplicados em um alimento, uma das técnicas mais conhecidas recebe o nome de “dipping” e é utilizada para aplicar camadas de monoglicerídeo acetilado em carnes e peixes e para cobrir de cera, frutas e vegetais.

O processo consiste em que o alimento seja mergulhado diversas vezes em uma solução a qual deverá cobri-lo uniformemente. Em seguida, o excesso de solução é retirado e o alimento é seco de maneira que uma fina película esteja formada em sua superfície irregular. Outra opção chamada *spraying* é usada para cobrir somente uma das superfícies do alimento e é utilizada para reticular filmes de alginato e/ou pectina. E, finalmente, uma última técnica conhecida por *casting* ou evaporação, é simples e muito utilizada para formação de biofilmes, pois é bastante reprodutível. Seu emprego consiste em depositar certa quantidade de solução sob uma superfície lisa formando uma camada (espessura desejada de acordo com a quantidade depositada) a qual é subsequente evaporada. Em se tratando de *casting* ou evaporação, esta é sem dúvida, a técnica mais utilizada pelos pesquisadores na formação de filmes. No entanto, há poucos relatos na literatura com relação a biofilmes “multicomponentes” contendo antioxidantes.<sup>14</sup>

Segundo Wu e colaboradores,<sup>1</sup> são necessários estudos mais aprofundados para se determinar a composição ótima de um filme e suas condições para sistemas alimentícios, bem como mais pesquisas com relação ao mecanismo de transferência de massa e a interação dos diferentes filmes com os alimentos. Além do processo de solubilização e escolha do método para a aplicação do biofilme, a adição de um plastificante e/ou um agente de reticulação, muitas vezes se faz necessário, com o propósito de melhorar as características finais do biofilme. Um plastificante irá reduzir a temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ), portanto, irá melhorar a processabilidade de um polímero. Em termos de definição, a temperatura de transição vítrea ou  $T_g$  é a temperatura na qual um polímero amorfo ou semicristalino, passa do estado vítreo para um estado borrachoso. Em outras palavras, é uma mudança de estado caracterizada pelo movimento molecular das cadeias de um polímero, modificando as características de processabilidade do mesmo.<sup>12,15</sup> O plastificante deverá ser compatível e miscível com o polímero de escolha, o que implica numa similaridade nas forças intermoleculares nos dois componentes. A eficiência do plastificante poderá ser definida, além da redução da transição vítrea, pelas propriedades mecânicas do filme ou pela massa molar do plastificante propriamente dito.<sup>12</sup>

Mangata e colaboradores<sup>16</sup> testaram a influência de dietanolamina, trietanolamina, como novos plastificantes para filmes de glúten e os compararam com filmes plastificados com glicerol. A solubilidade em água, a opacidade do filme e propriedades de barreira ao vapor d'água não modificaram significativamente, no entanto, mudanças nas propriedades mecânicas dependendo da umidade relativa (UR) foram observadas. Para os

filmes armazenados a 58% de umidade relativa, notadamente o aumento do conteúdo de plastificante levou a diminuição da resistência mecânica (diminuição da resistência a tração). Também foi observado aumento na elasticidade (diminuição do módulo de Young aparente) e aumento na extensibilidade (aumento da deformação na ruptura), provando que o uso de compostos amino ao invés de glicerol melhorou as propriedades dos filmes de glúten.

Em 2003, Mangavel e colaboradores<sup>17</sup> testaram a influência de uma série de plastificantes hidrofílicos variando o comprimento de suas cadeias (etilenoglicol e moléculas maiores) em filmes de glúten e verificaram que quando considerado em bases molares (moles de plastificante por mole de aminoácido), o efeito dos plastificantes depende de sua respectiva massa molar por plastificante/faixa de aminoácido entre 0,1-0,4. Entretanto, acima desta proporção de 0,4-0,5 mol/mol de aminoácido, não foram observadas mudanças e a resistência à tração alcançou um platô com todos os plastificantes estudados.

De fato, quando uma série homóloga de moléculas foi considerada, a habilidade do plastificante em diminuir a tensão e aumentar a deformação estava relacionada com o número de ligações de hidrogênio disponíveis para interagir com a rede de proteínas. A eficiência do etilenoglicol foi, entretanto, menor que o esperado provavelmente devido ao pequeno tamanho desta molécula. O efeito particular do glicerol e sua concentração sugere que as propriedades mecânicas do filme sofrem efeito de outros fatores, como por exemplo, o número e a posição de grupos OH na molécula os quais estariam envolvidos no processo plastificante no filme.

Com a adição do agente de reticulação ou reticulante, as cadeias poliméricas se tornam ligadas, formando uma rede ou retículo através de ligações cruzadas (Figura 3.2).<sup>18</sup> Os polímeros quando reticulados exibem diferenças consideráveis em suas propriedades, dependendo do grau de reticulação e do método de preparação. Em geral, o grau de reticulação pode ser determinado pela solubilidade, extensão de inchamento, tamanho dos poros e estabilidade mecânica. Outra mudança importante dentro deste aspecto é a de que as ligações cruzadas são capazes de afetar a temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ) de um polímero, pois à medida que se aumenta a densidade de reticulação, diminui-se o volume livre e, portanto, a  $T_g$  aumenta.<sup>19</sup>

Portanto, algumas vantagens<sup>20</sup> conseqüentes do processo de reticulação podem ser enumeradas:

- 1) Ao tornarem-se insolúveis em muitos solventes, os polímeros oferecem

alternativas no processamento;

- 2) O polímero com baixo grau de reticulação incha extensivamente, expondo seu interior para reagentes solúveis;
- 3) Podem ser preparados na forma de esferas, as quais não coalescem quando colocadas em um solvente, portanto, podem ser separados de contaminantes de baixa massa molar pelo simples processo de lavagem ou filtração com vários solventes.

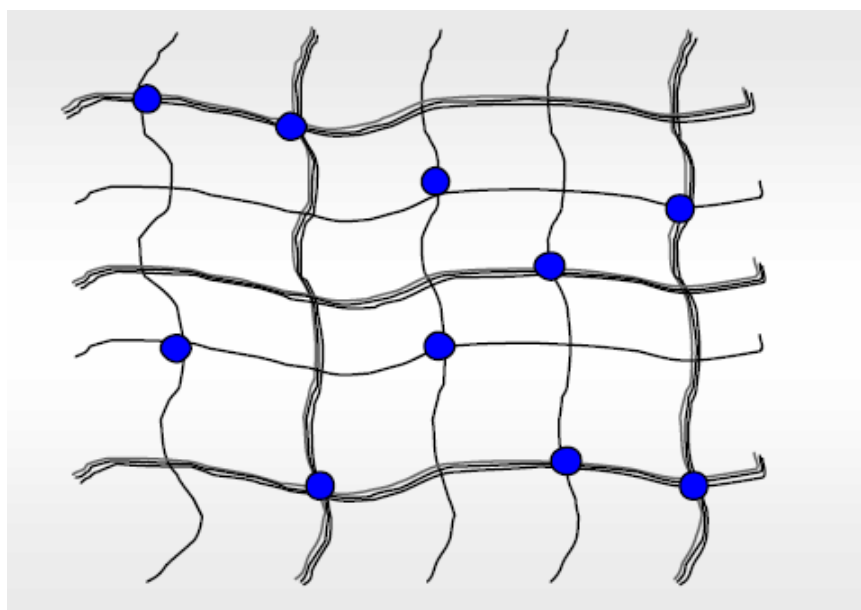


Figura 3.2 – Representação esquemática de uma rede polimérica. As ligações cruzadas estão representadas através dos círculos entre as linhas.<sup>18</sup>

Visando melhorar a sensibilidade à água e evitar solubilização dos filmes, Coma e colaboradores<sup>21</sup> elaboraram filmes de hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) reticulados com ácido cítrico em diferentes concentrações e na presença de um catalisador. O ácido cítrico possui a capacidade de formar um anidrido cíclico altamente reativo sob determinadas condições térmicas. Para determinar a taxa de reticulação nos derivados celulósicos, análise de espectroscopia de infravermelho baseada no aparecimento de uma banda a  $1735\text{ cm}^{-1}$  foi comparada com uma titulação ácido-base. Os autores observaram que a espectroscopia de infravermelho apresentou vantagens quanto ao tempo de análise. Já os polímeros hidrofílicos reticulados melhoraram sua barreira ao vapor d'água em torno de 34%.

Delville e colaboradores<sup>22</sup> avaliaram uma nova classe de amidos reticulados, os quais foram sintetizados no estado sólido através da irradiação ultravioleta (UV). Segundo os autores este tratamento era novo e nenhum agente reticulante foi usado. Os fotosensibilizadores utilizados eram solúveis em água e membros da família do ácido benzóico, portanto, capazes de reticular o amido mesmo em concentrações abaixo de 0,1%. A cinética de reticulação foi determinada através do grau de inchamento. A densidade de reticulação foi avaliada variando-se a exposição à radiação UV (1 – 10 minutos). Embora a densidade reticulada no final tenha sido relativamente baixa, foi suficiente para render um amido insolúvel em dimetilsulfóxido (DMSO). No entanto, as propriedades mecânicas tiveram somente um leve aumento devido à baixa taxa de reticulação.

De Carvalho e Grosso<sup>23</sup> introduziram modificações químicas (formaldeído, glioxal) e enzimáticas (transglutaminase) no intuito de melhorar e comparar a solubilidade, propriedades mecânicas, de barreira, propriedades térmicas e morfologia de filmes feitos a base de gelatina. Os resultados indicaram que os tratamentos reduziram em 20% a solubilidade de todos os filmes, enquanto que a maior redução na permeabilidade ao vapor d'água ocorreu nos filmes reticulados enzimaticamente (em torno de 35% quando comparado com os filmes sem reticulação). Segundo os autores, apesar da redução na permeabilidade ao vapor d'água obtida com as modificações químicas e enzimáticas, os filmes finais ainda apresentavam curvas de adsorção similares àquelas feitas com os filmes nativos, ou seja, os filmes de gelatina ainda estavam suscetíveis a umidade, o que limitava suas condições finais de uso.

Rim e sua equipe<sup>24</sup> utilizaram à radiação ultravioleta (UV) em soluções de filmes elaborados com glúten, zeína, albumina de ovo e solução de caseinato. Ao final, os filmes foram avaliados quanto à resistência a tração, quantidade de material solúvel e permeabilidade ao vapor d'água. O tratamento com UV aumentou a resistência à tração nos filmes de zeína, glúten e albumina. Os filmes de caseinato tiveram sua resistência aumentada, no entanto, apresentaram uma redução na quantidade material solúvel.

Finalmente, após a definição de alguns aspectos citados nos parágrafos anteriores (escolha do plastificante, agente de reticulação ou reticulante), define-se o grupo de características necessárias para o processo de caracterização e estudo de um biofilme, independente da fonte do polímero utilizado (polissacarídeo, proteína, sintético, etc.). Torna-se evidente que a permeabilidade ao vapor d'água, resistência à tração, porcentagem de alongação, capacidade de adsorção e determinação do material solúvel, dentre outros parâmetros, estão entre as características essenciais para caracterização de um biofilme,

independente da adição de plastificante ou agente de reticulação.

Desta forma, Turhan *et al.*<sup>25</sup> observaram que não somente estas informações eram válidas, como também a formação do filme era afetada pela concentração do polímero no filme, porcentagem de solvente (etanol) adicionado a solução e massa molar do plastificante utilizado. Ao elaborar filmes comestíveis a base de metilcelulose (MC) plastificados com polietilenoglicol (PEG), obtiveram valores entre  $0,232 \times 10^{-10}$  e  $1,160 \times 10^{-10}$  g/m s Pa, para permeabilidade ao vapor d'água (WVP), 17 e 44 N/mm<sup>2</sup> para tensão na ruptura (TS) e a porcentagem de alongação (% E) ficou entre 14 e 97 % dependendo da composição. Por outro lado, a incorporação de plastificantes, com diferentes massas molares e o aumento de sua concentração elevaram os valores de permeabilidade ao vapor d'água, porcentagem de alongação e diminuíram a tensão de ruptura. Os filmes contendo PEG tiveram maior solubilidade e esta diminuiu com o aumento da massa molar do plastificante. As diferenças estruturais para os filmes plastificados e não plastificados foram explicadas em termos de ligações de hidrogênio entre o plastificante e as cadeias do polímero, e sua não ocorrência no caso do plastificante com maior massa molar.

A estabilidade térmica de biofilmes se mostra como mais um parâmetro a ser avaliado. Os eventos térmicos que ocorrem quando um material é aquecido são geralmente relacionados com sua estrutura e o comportamento térmico do mesmo. Barreto, *et al.*<sup>26</sup> avaliaram a degradação térmica de filmes comestíveis de caseinato de sódio, proteínas do leite e gelatina plastificados com sorbitol, através de análises termogravimétricas e espectroscopia de infravermelho em atmosfera de nitrogênio. Através destas análises, os autores observaram que a adição de sorbitol diminuiu gradativamente a energia de ativação de degradação dos polímeros. Esta diminuição foi atribuída ao efeito do sorbitol nas ligações de hidrogênio inter e intramoleculares nas proteínas.

Em pesquisa recente, Soares, *et al.*<sup>27</sup> também avaliaram a estabilidade térmica de filmes elaborados a base de xantana com diferentes amidos. Neste trabalho, os autores observaram que a adição do amido levou ao aumento da estabilidade térmica, o que pode ser observado pelo aumento dos valores de energia de ativação ( $E_a$ ) tanto para os filmes de xantana/amido de milho, quanto para os filmes de xantana/amido de trigo. Estudos em filmes de soja com adição de dodecil sulfato de sódio (SDS) mostraram que a adição de SDS reduziu marcadamente a energia de ativação nos filmes. Segundo os autores, este comportamento ocorreu em concordância com a redução da temperatura inicial de degradação observada através das análises termogravimétricas. A interação eletrostática e hidrofóbica entre os



componentes do filme diminui a estabilidade térmica rompendo as ligações intermoleculares de baixa energia que mantêm a conformação da proteína. O espectro dos produtos voláteis formados revelou a formação de CO<sub>2</sub>, CO, NH<sub>3</sub> e outros compostos insaturados sugerindo que o mecanismo da reação ocorreu por cisão de grupos C-N, C (O) - NH, C (O) - NH<sub>2</sub>, - NH<sub>2</sub> e C (O) – OH presentes na proteína.<sup>28</sup>

### 3.3 Produção de Biofilmes a partir de Proteínas

#### 3.3.1 Proteínas

Um crescente interesse por filmes elaborados a base de proteína tem surgido nos últimos anos (Tabela 3.2).

Tabela 3.2 – Proteínas utilizadas na elaboração de filmes comestíveis, biodegradáveis e embalagens em geral.<sup>29</sup>

PROTEÍNA	Solventes utilizados			
	Água	Condições ácidas	Condições básicas	Água/etanol
colágeno		☒		
gelatina	☒			
proteína de peixe		☒	☒	
queratina				☒
albumina do ovo			☒	
caseína	☒			
zeína				☒
glúten		☒	☒	☒
farelo de arroz		☒	☒	
proteína de soja	☒		☒	
sementes de algodão			☒	

Estes tipos de filmes têm apresentado excelentes propriedades de barreira,  $O_2$  e aroma a baixas umidades relativas.<sup>29</sup> No entanto, a característica polar das proteínas determina as suas propriedades de barreira e a formação de materiais baseados neste componente irá depender, sobretudo, da estrutura das proteínas, heterogeneidade estrutural, sensibilidade ao calor e características hidrofóbicas/hidrofílicas.<sup>16,30-32</sup> Filmes a base deste polímero natural, geralmente apresentam alta permeabilidade a substâncias polares e baixa permeabilidade a substâncias não polares ( $O_2$ , aromas e óleos), ou seja, a escolha certa do tipo de proteína, plastificante e condições de formação, ao mesmo tempo em que se mantém características de flexibilidade, resistência e solubilidade, são fatores de grande importância.<sup>29</sup>

As proteínas apresentam conceitualmente quatro níveis de organização: estruturas primária, secundária, terciária e quaternária (Figura 3.3).

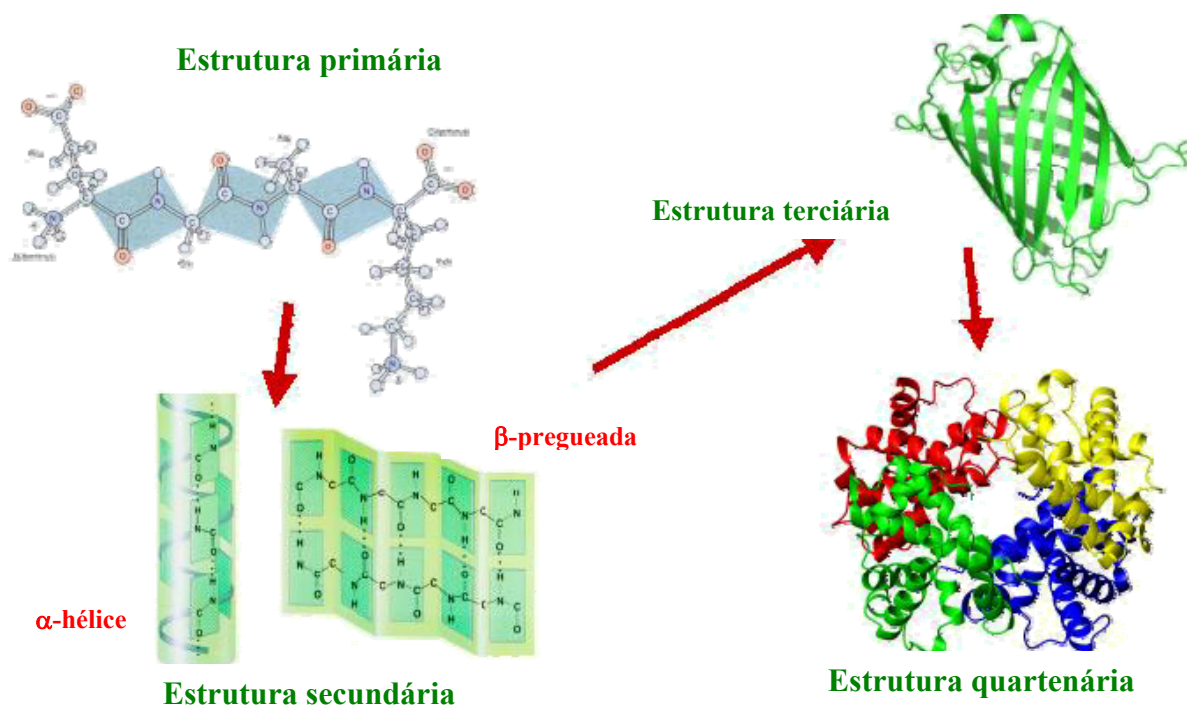


Figura 3.3 – Representação esquemática das estruturas primária, secundária, terciária e quaternária de uma proteína.<sup>33</sup>

A estrutura primária inclui todas as ligações covalentes entre os aminoácidos e normalmente é definida pela sequência de aminoácidos ligados. A estrutura secundária refere-se ao arranjo regular e recorrente no espaço adjacente dos resíduos de aminoácidos na cadeia peptídica. A estrutura terciária refere-se à relação espacial entre todos os aminoácidos na cadeia polipeptídica; é na verdade a estrutura tridimensional da proteína. Já as proteínas que

possuem várias cadeias polipeptídicas possuem uma estrutura quaternária, a qual se refere à relação espacial dos polipeptídeos, ou subunidades dentro da proteína.<sup>34</sup> As estruturas primária, secundária, terciária e quaternária podem ser modificadas por uma série de agentes físicos ou químicos, incluindo calor, tratamento mecânico, pressão, irradiação, ácidos, álcalis ou ainda, íons metálicos. Geralmente estes agentes são utilizados na formação de filmes de proteína de maneira a otimizar, configuração, interação e suas propriedades finais.<sup>29</sup>

No caso da desnaturação de uma proteína globular a qual é mantida através de fracas interações intramoleculares, uma pequena mudança na temperatura ou pH irão romper a estrutura terciária e fazer com que a proteína torne-se desnaturada. A desnaturação ocorre de maneira que as ligações covalentes não sejam afetadas; a estrutura peptídica primária mantém-se intacta, porém a estrutura terciária desdobra-se e torna-se uma cadeia enovelada aleatoriamente (Figura 3.4).<sup>35</sup>

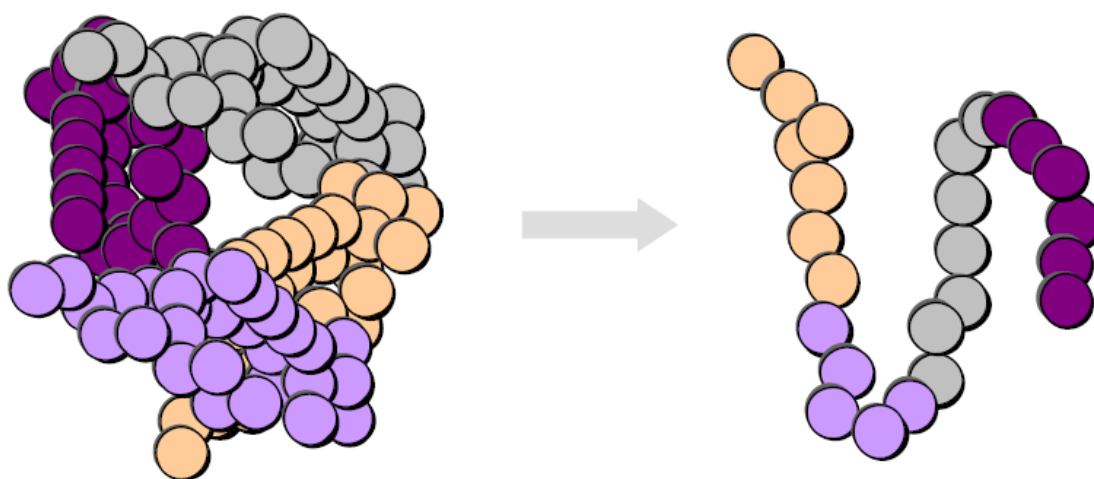


Figura 3.4 – Representação esquemática do processo de desnaturação de uma proteína.

### 3.3.2 Glúten

As proteínas do trigo são responsáveis por cerca de 8-15% do peso total do grão e quase 70% do seu conteúdo está presente no endosperma, a maior fonte de farinha de trigo. O fracionamento da farinha dá origem a quatro classes distintas de proteínas: albuminas, globulinas, prolaminas e glutelinas. Os termos gliadina e glutenina são utilizados para a fração prolamina e glutelina, respectivamente. Estas são as principais proteínas do trigo, sendo responsáveis por aproximadamente 85% do conteúdo total de proteínas, enquanto que o

restante é composto por albuminas e globulinas e estruturas peptídicas menores. O nome “glúten” é dado ao conjunto de classes de proteínas que o constituem (albuminas, globulinas, prolaminas e glutelinas) as quais em conjunto, conferem propriedades viscoelásticas a este material.<sup>36</sup>

A elaboração de filmes de glúten nas últimas décadas foi liderada por grupos que avançam em perspectivas, quanto a sua aplicação. Em 1993, a equipe composta por Gontard e colaboradores<sup>31</sup> publicou um trabalho verificando a influência da água e do glicerol como plastificantes nas propriedades mecânicas e de barreira de filmes comestíveis de glúten de trigo. O grupo observou que o glicerol melhorou a extensibilidade, mas reduziu a resistência à tração, elasticidade e propriedades de barreira ao vapor d'água. O efeito plastificante da água foi altamente relacionado à temperatura e, durante a hidratação do glúten, uma pequena redução na resistência à tração, elasticidade e aumento na extensibilidade e taxa de transmissão de vapor d'água foram observados a 5, 30 e 50 °C. Os autores observaram que a atividade de água e a temperatura eram parâmetros cruciais em filmes a base de glúten e em filmes em geral, os quais são plastificados pela água.

A partir de então, este mesmo grupo realizou estudos visando o melhoramento das propriedades de barreira de filmes de glúten e elaboraram várias formulações e métodos de formação de filmes comestíveis consistindo de: glúten como barreira estrutural e uma fina camada lipídica como barreira anti-umidade. Segundo os autores, a permeabilidade alcançada pelos filmes bicamada foram superiores aos apresentados por vários filmes citados na literatura, porém a sensibilidade à umidade relativa ainda era um fator relevante a ser considerado em trabalhos futuros.<sup>36</sup>

Alguns anos mais tarde, Mangata e colaboradores<sup>37</sup> elaboraram filmes bicamada, porém utilizando resinas de epóxi acrilato (EA) e uretano acrilato (UA) curadas por radiação ultravioleta (UV). As resinas foram depositadas como uma fina camada uniforme sobre os filmes de glúten já elaborados. Os resultados obtidos demonstraram uma melhora na resistência à água e propriedades de barreira ao vapor d'água. Porém, as propriedades requeridas para uma embalagem não puderam ser alcançadas uma vez que as propriedades mecânicas dos filmes foram inferiores aquelas dos filmes de glúten originais.

Em 2000, Micard e Guilbert<sup>38</sup> verificaram o comportamento térmico de glúten de trigo nativo e quimicamente modificado e de suas frações gliadina e glutenina, com adição de uma massa de água variando de 0 a 0,2% e através de estudos com calorimetria exploratória diferencial modulada (MDSC). Foi observado que os valores da  $T_g$  para o glúten e suas

frações não plastificadas, ficaram em torno de 175 °C independente do tratamento realizado. Quando realizado o ajuste da  $T_g$  em função da quantidade de água, através da equação de Gordon-Taylor, as frações de glúten ricas em glutenina demonstraram maior sensibilidade ao efeito plastificante da água do que a fração gliadina. Com estes resultados, os autores concluíram que o glúten é uma blenda miscível de gliadina e glutenina, pois os valores encontrados para a  $T_g$  do glúten foram intermediários aos valores de  $T_g$  dos componentes individuais em suas frações.

Micard e colaboradores<sup>39</sup> continuaram suas investigações, porém realizando modificações químicas (formaldeído) e físicas (temperatura, UV e radiação  $\gamma$ ) em filmes de glúten. Os autores observaram que o tratamento térmico e a adição de formaldeído melhoraram significativamente a resistência mecânica dos filmes e que a solubilidade em água foi levemente afetada, sendo a permeabilidade ao vapor d'água não afetada. Outro fator relevante foi a quase completa insolubilização das proteínas tratadas com formaldeído quando submetidas ao tratamento térmico em dodecil sulfato de sódio. Este comportamento ocorreu provavelmente devido à modificação da rede de proteínas, levando a mudanças em suas propriedades finais.

Diversos estudos continuaram sendo realizados no intuito de melhorar as propriedades mecânicas e de barreira do glúten e verificar quais as influências experimentais (umidade relativa, temperatura de secagem) afetariam as propriedades finais do filme.<sup>40-46</sup> Ainda em 2000, Morel e colaboradores<sup>47</sup> diferentemente dos trabalhos realizados anteriormente, investigaram os efeitos da análise do glúten. Dentro deste contexto, medidas de grupos tiol/dissulfeto foram realizadas. A sulfitólise teria sido escolhida porque os grupos “tiol” liberados nesta reação, poderiam ser convertidos em grupos dissulfeto durante a secagem dos filmes, contribuindo para o fortalecimento da estrutura de rede de glúten. A oxidação dos grupos tiol confirmou a formação de ligações intercadeias entre classes específicas de proteínas do glúten através de um processo ordenado. Com isso, os filmes de glúten apresentaram mais grupamentos macromoleculares de glutenina insolúveis do que o glúten nativo.

As próximas pesquisas avançaram no sentido de se estudar novos plastificantes para filmes de glúten. Neste caso, dietanolamina e trietanolamina foram selecionadas. Comparativamente ao glicerol, o plastificante mais comumente utilizado em filmes de glúten, o uso destes plastificantes não afetou a solubilidade em água, opacidade do filme e propriedades de barreira. Contudo, houve um aumento na extensibilidade e elasticidade dos

filmes.<sup>16</sup>

Em outro trabalho similar, a permeabilidade ao vapor d'água também apresentou resultados significativos com o uso de ácidos graxos saturados com diferentes comprimentos de cadeia (6 a 10 carbonos), quando comparados aos filmes plastificados com glicerol. Porém, houve um limite de compatibilidade entre os ácidos graxos e o glúten, evidenciados através de uma relação exponencial: quanto maior o comprimento da cadeia do ácido graxo, menor a quantidade compatível com glúten.<sup>48</sup>

Em 2004, este grupo<sup>49</sup> realizou ensaios de biodegradabilidade com filmes de glúten, o material foi submetido a parâmetros de controle bioquímicos, os quais demonstram a quantidade de proteínas agregadas. Esta quantidade pode ser relacionada com a densidade de reticulações covalentes na rede de glúten, as quais foram induzidas através de tratamentos tecnológicos. Os testes de biodegradabilidade foram realizados em meio líquido e no solo. Os pesquisadores observaram que todo o material foi inteiramente degradado depois de 36 dias em fermentação aeróbica e dentro de 50 dias no solo. O tempo de meia-vida de mineralização de 3,8 dias, fez com que o material estivesse entre os polímeros rapidamente degradados. Os testes de inibição microbiana não revelaram toxicidade para o glúten modificado e seus metabólitos. Portanto, com este trabalho, pôde-se concluir que as proteínas do glúten são não-tóxicas e inteiramente biodegradáveis seja qual for o processo tecnológico empregado.

Os estudos com filmes de glúten apresentam ainda diversas vertentes e, portanto, muitos parâmetros precisam ser analisados e, novas discussões elaboradas. Dentro deste segmento, uma nova linha de pesquisa tem merecido atenção e é o foco da presente proposta de tese. O uso de uma das frações de glúten, ainda não totalmente elucidada estruturalmente e que tem se mostrado interessante na elaboração de biofilmes: a gliadina, uma proteína monomérica que será discutida no tópico a seguir.

### 3.3.3 Gliadina

A gliadina é uma proteína monomérica e globular que constitui a fração prolamina do glúten (Figura 3.5), é um polipeptídeo de baixa massa molar (30.000 a 74.000 g mol<sup>-1</sup>, normalmente 50.000 g mol<sup>-1</sup>) e possui uma nomenclatura geral baseada na sua mobilidade eletroforética em pH ácido:  $\alpha$ -gliadina,  $\beta$ -gliadina,  $\gamma$ -gliadina e  $\omega$ -gliadina. As  $\beta$ -gliadinas,  $\alpha$ -gliadinas e  $\gamma$ -gliadinas possuem características estruturais semelhantes, consistindo de domínios repetitivos N-terminal e não-repetitivos C-terminal, com três ou quatro ligações

dissulfeto intramoleculares. Já a  $\omega$ -gliadina é estruturalmente distinta, sendo formada por um único domínio repetitivo sem resíduos de *L*-cisteína e, conseqüentemente, sem ligações dissulfeto.

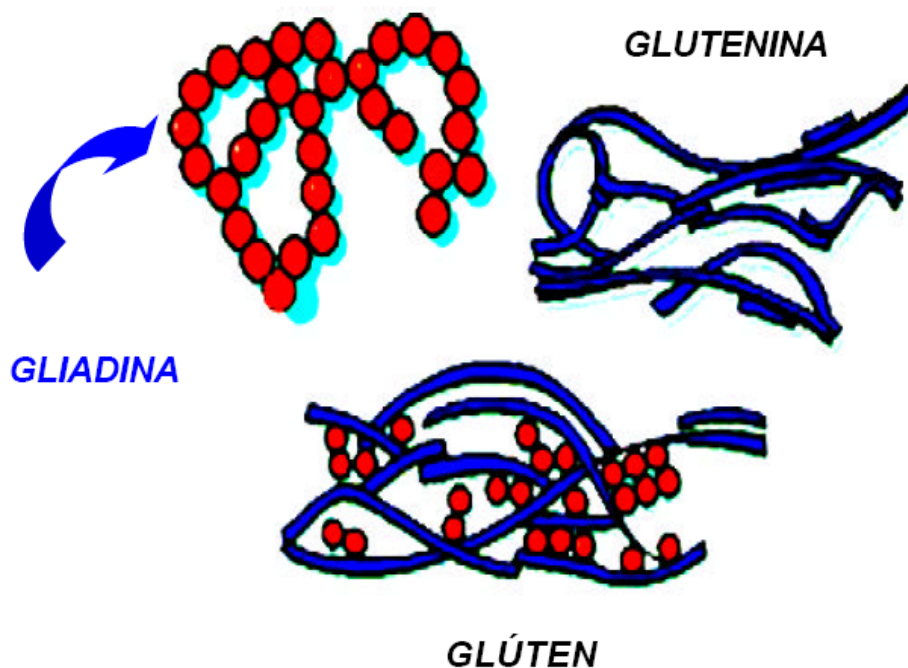


Figura 3.5 – Esquema ilustrativo da fração gliadina e glutenina no glúten.<sup>50</sup>

Estudos recentes evidenciam que a estrutura da gliadina e/ou suas frações ainda não é (são) completamente conhecida (s) (Figura 3.6) o que a torna muito interessante sob o ponto de vista científico em diversas áreas.<sup>8,35,51-54</sup>

Filmes de gliadina preparados a partir de soluções alcalinas foram elaborados por Sánchez, et al.<sup>55</sup> Os autores avaliaram o efeito de diferentes plastificantes nas propriedades mecânicas e reológicas dos filmes e soluções, respectivamente. Foram testados cinco polióis da série do polietilenoglicol e glicerol para efeitos de comparação. Glicerol e tetraetilenoglicol foram os mais eficientes, sendo que a viscosidade das soluções obtidas com glicerol foi superior as demais.

Pelo fato da estrutura das proteínas do trigo não serem conhecidas em solução e durante a secagem de filmes, Mangavel e colaboradores<sup>56</sup> estudaram as mudanças conformacionais da molécula de gliadina durante a formação dos filmes, através de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). Com este trabalho, os

autores desejavam elucidar a relação entre as propriedades mecânicas e a estrutura secundária das proteínas.

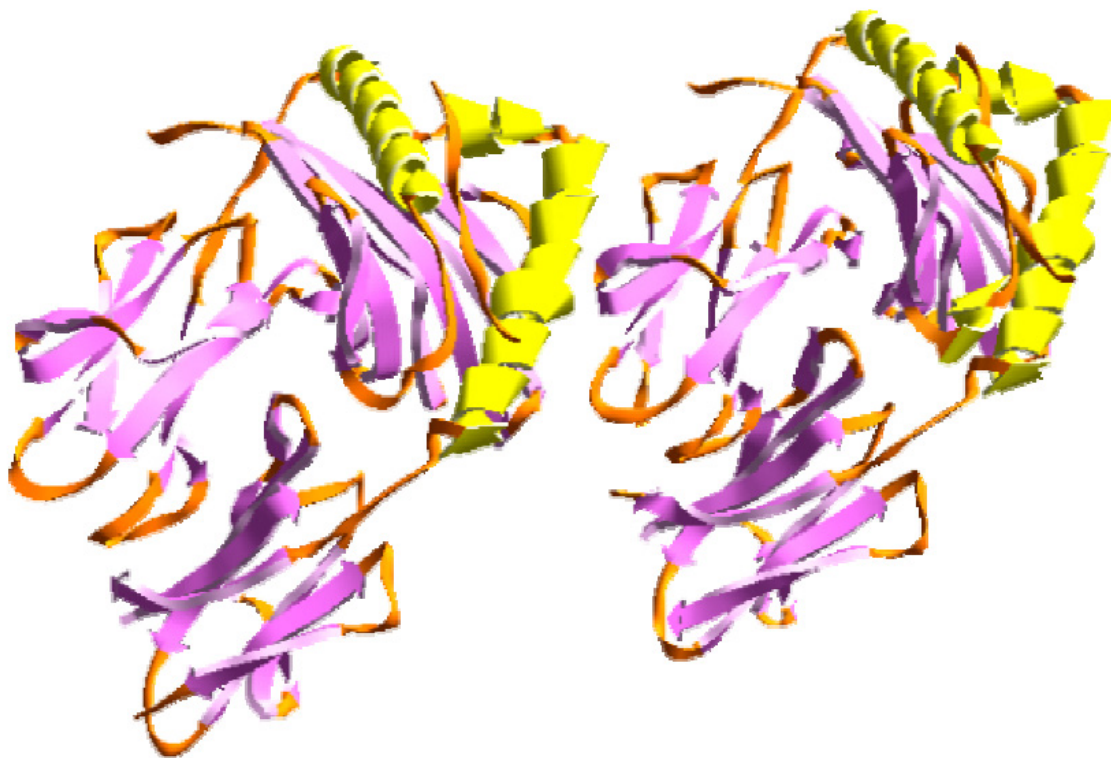


Figura 3.6 – Representação esquemática da estrutura tridimensional da gliadina.<sup>57</sup>

Nas soluções filmogênicas avaliadas, a gliadina apresentou uma mistura de diferentes estruturas secundárias com uma importante contribuição de folhas beta, induzida por resíduos de prolina. A evolução da conformação protéica foi continuamente monitorada durante a secagem dos filmes e o aparecimento de uma banda em  $1622\text{ cm}^{-1}$  evidenciou a presença de folhas  $\beta$  com ligações de hidrogênio intermoleculares e agregados de proteína durante a secagem dos filmes. Em seguida, a influência da temperatura de secagem na estrutura secundária dos filmes foi estudada: temperaturas mais altas induziram ao aumento da resistência a tração e da quantidade de agregados com folhas- $\beta$ . No entanto, não foi possível determinar se há uma relação direta entre a ocorrência de agregados e o aumento da resistência à tração nos filmes.

Em trabalhos recentes publicados por Muñoz e seu grupo,<sup>58</sup> foram extraídas gliadinas e gluteninas de glúten comercial e a partir das frações obtidas, as soluções filmogênicas e os



filmes foram estudados para fins comparativos. Os filmes elaborados a partir de glutenina apresentaram-se mais resistentes e menos extensíveis enquanto que os filmes de gliadina apresentaram melhor aparência visual e se desintegraram em água. Com estas observações os autores sugeriram que as pesquisas com filmes de glutenina fossem voltadas para embalagens convencionais, enquanto que filmes de gliadina poderiam ser utilizados como filmes comestíveis. Partindo destes estudos e suas principais observações, os mesmos pesquisadores publicaram vários trabalhos<sup>59-63</sup> nos anos subseqüentes tentando avaliar o efeito da reticulação em filmes de glutenina, avaliar o efeito do tratamento térmico nas propriedades funcionais de filmes comestíveis elaborados a partir de frações de glúten, caracterizar filmes obtidos a partir de gliadinas polimerizadas por resíduos de L-cisteína, reticular gliadina com formaldeído e glutenina com diferentes aldeídos.

Os principais resultados obtidos nestas recentes pesquisas encontram-se resumidos na Tabela 3.3, e sugerem que filmes ou soluções elaborados a partir desta macromolécula podem ser quimicamente ou enzimaticamente modificados e desenvolvidos sob diversas condições experimentais.

Em se tratando das possíveis modificações estruturais das macromoléculas presentes em solução e/ou suspensão, as técnicas de espalhamento de raios X a baixos ângulos (SAXS) e experimentos reológicos têm sido largamente empregadas com este propósito.<sup>64-66</sup>

No caso da primeira técnica, as investigações podem ser úteis para se avaliar o efeito da adição de diferentes reagentes na estrutura global do polímero. Neste sentido, Yuguchi e colaboradores (2003)<sup>67</sup> avaliaram o efeito da adição de contra-íons em  $\kappa$ -carragena, um polissacarídeo extraído de algas e amplamente utilizado como aditivo em alimentos. O mecanismo de gelificação deste polissacarídeo está envolvido com a adição de contra-íons específicos, e a dependência destes íons pôde ser avaliada por experimentos de espalhamento de raios X a baixos ângulos.

Não obstante, a associação das técnicas de SAXS e reologia pode subsistir em complementaridade. Este foi o caso para as microemulsões formadas por óleo de soja, surfactante e água estudadas por Polizelli e colaboradores (2006),<sup>68</sup> enquanto o estudo da reologia permitiu avaliar as diferenças no comportamento da viscosidade, a técnica de SAXS pode elucidar as modificações estruturais relevantes e relacionadas às mudanças observadas.

Entretanto, o objetivo final parece ainda não alcançado, tornando possível a avaliação de muitos parâmetros não estudados até o momento. A elucidação do comportamento destes

sistemas irá permitir a continuidade desta pesquisa e torná-la algo necessário para o entendimento do comportamento de biopolímeros, seja em solução, biofilmes ou ainda, nas diversas formas e aplicações que venham a surgir futuramente.

Tabela 3.3 – Resumo dos principais trabalhos desenvolvidos com filmes de gliadina nos últimos anos.

<b>Grupo de pesquisa</b>	<b>Objetivos</b>	<b>Resultados observados pelos autores</b>
Muñoz e colaboradores (2003) <sup>58</sup>	Caracterizar filmes preparados a partir de diferentes frações de proteína	<i>Filmes de glutenina apresentaram maior resistência à tração, menor elongação na ruptura e permeabilidade ao vapor d'água, quando comparado aos filmes de gliadina. Os filmes de gliadina se desintegram na água.</i>
Muñoz e colaboradores (2004) <sup>63</sup>	Avaliar o efeito do tratamento térmico sobre as propriedades funcionais dos filmes	<i>O aquecimento a diferentes temperaturas por 24 h tornou os filmes mais resistentes e menos extensíveis. Houve redução da permeabilidade ao vapor d'água</i>
Muñoz e colaboradores (2004) <sup>61</sup>	Avaliar filmes obtidos a partir de gliadina polimerizada com L-cisteína	<i>Os filmes de gliadina tornaram-se menos extensíveis enquanto que a resistência à tração aumentou. As propriedades mecânicas tornaram-se semelhantes às observadas para os filmes de glutenina.</i>
Muñoz e colaboradores (2004) <sup>59</sup>	Avaliar as propriedades de permeação ao vapor d'água de filmes polimerizados com L-cisteína	<i>A resistência ao vapor d'água foi aumentada, alcançando valores próximos àqueles obtidos para filmes de glutenina</i>
Muñoz e colaboradores (2004) <sup>60</sup>	Reticular filmes de gliadina com formaldeído	<i>A reticulação tornou os filmes insolúveis em água. O efeito da adição de glicerol e da umidade na permeabilidade ao vapor d'água e nas propriedades mecânicas foram reduzidos nos filmes reticulados.</i>

### **COMPORTAMENTO DE SUSPENSÕES DE GLIADINA NATIVA E RETICULADA ATRAVÉS DA TÉCNICA DE ESPALHAMENTO DE RAIOS X A BAIXOS ÂNGULOS (SAXS)**

#### *4.1 Resumo*

Neste capítulo foram estudadas suspensões de gliadina não modificada (ou nativa) e reticuladas por dois agentes diferentes na ausência e presença de glicerol como plastificante. O estudo da influência da variação de concentração de glicerol e dos diferentes reticulantes na suspensão de gliadina também foi realizado. Os compostos químicos escolhidos como reticulantes foram: Hidrocloreto de 1-(3-Dimetilaminopropil-3-etil-carbodiimida)/N-hidroxisuccinamida [EDC/NHS] e L-cisteína, respectivamente. A caracterização e comparação dos diferentes sistemas foram realizadas através da técnica de espalhamento de raios X a baixos ângulos (SAXS). Para obtenção dos raios de giro ( $R_g$ ) e raio da secção transversal ( $R_c$ ) empregou-se a análise de Guinier, a qual também serviu indiretamente como um indicativo de possíveis modificações químicas e conformacionais nos sistemas com [EDC/NHS] e L-cisteína. Em um estudo posterior, a análise de Kratky também foi empregada para a investigação das características estruturais da proteína, onde se estudou o efeito da adição dos diferentes componentes na manutenção ou modificação da estrutura global da gliadina.

#### *4.2 Procedimento Experimental*

##### *4.2.1 Materiais*

As amostras de gliadina foram fornecidas pela Midwest Grain Products, Inc. (Atchison, KS). A gliadina foi identificada como contendo um mínimo de 80 % de proteína (N x 5,7), < 6,0 % de cinzas e entre 3,0 e 6,0 % de umidade. Glicerol, etanol, L-cisteína (L-Cys) e hidrocloreto de 1-(3-Dimetilaminopropil)-3-etil-carbodiimida/N-hidroxisuccinamida [EDC/NHS] foram obtidos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO).

Para fins de identificação, a massa molar da gliadina foi determinada através de eletroforese em gel de poliacrilamida (12 %) (SDS-PAGE) (Ver Fig. 5.9 no capítulo 5). Portanto, a gliadina utilizada neste estudo contém a maioria de seus polipeptídios com massa molar ( $M_w$ ) situada na região entre 37.000 a 50.000 g mol<sup>-1</sup>, com uma pequena quantidade de componentes com massa molar maior, na região de 75.000 g mol<sup>-1</sup>. Os resultados correspondem aos valores encontrados na literatura<sup>69-71</sup> e supõem que as diferentes massas molares correspondam as subfrações de  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\omega$ -gliadina.

#### *4.2.2 Preparo das suspensões de proteína*

Para as medidas de espalhamento de raios X a baixos ângulos (SAXS), 4 g de gliadina foram dissolvidas em uma mistura contendo 40 mL de etanol/água destilada 60/40 % (v/v). Às suspensões preparadas foram adicionadas diferentes concentrações de glicerol (plastificante): 0, 5, 10, 15 e 20 % (m/m de gliadina). O pH das dispersões foi ajustado para de 4,0 com adição de HCl (0,1 M) quando o agente de reticulação a ser utilizado era o [EDC/NHS]. Neste caso, concentrações de [EDC/NHS] de 1,5; 3,0; 6,0 e 12 % (m/m de gliadina) foram empregadas. Para as suspensões tratadas com L-cisteína (0,5; 1,5 e 3,0 % m/m de gliadina) o pH situou-se na faixa entre 10 e 11 e foi alcançado mediante adição de NH<sub>4</sub>OH (0,1 M). As suspensões de gliadina não modificadas por qualquer promotor de reticulação foram preparadas em pH 10 conforme estudos previamente realizados em laboratório. Uma vez preparadas as suspensões dos diferentes sistemas (com e sem a adição de reticulantes), as mesmas eram submetidas ao aquecimento a 55 °C cerca de 25 min sob agitação constante. Em seguida as suspensões eram resfriadas a temperatura ambiente e submetidas à análise.

#### *4.2.3 Análise de espalhamento de raios X a baixos ângulos (SAXS)*

As análises de SAXS foram realizadas no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS, Campinas, Brasil). Os padrões de espalhamento foram registrados em detector unidimensional. O comprimento de onda ( $\lambda$ ) de 1,608 Å foi selecionado e a distância amostra-detector empregada foi de 730,4 nm para obtenção de intensidade de espalhamento com valores de  $q$  situados entre 0,001 e 0,4 Å<sup>-1</sup>. Os dados obtidos foram normalizados pela intensidade da luz incidente e corrigidos para a janela não homogênea do detector. O espalhamento de um branco (tampão) foi subtraído e a diferença das curvas foi utilizada para

todas as amostras analisadas.

Durante as medidas de espalhamento, as suspensões de proteína modificadas e não modificadas foram mantidas a temperatura de  $25 \pm 0.1$  °C. As curvas de espalhamento foram analisadas pelo método desenvolvido por Guinier, considerando  $I(0)$  como a intensidade de espalhamento corrigida e  $q = (4\pi/\lambda) \sin \theta$ , o vetor de espalhamento. Na presente metodologia, a Equação 4.1 é frequentemente utilizada para analisar o espalhamento de sistemas isotrópicos fornecendo informações muito úteis quanto ao tamanho e forma da partícula.

$$\ln I = \ln I(0) - \frac{1}{3} q^2 R_g^2 \quad (4.1)$$

Através das equações 4.1 e 4.2, obtêm-se o raio de giro ( $R_g$ ) e o raio da secção transversal ( $R_c$ ), respectivamente. Estes parâmetros são obtidos a partir da inclinação da reta nos gráficos de Guinier. Seguindo este mesmo raciocínio,  $R_g$  e  $R_c$  serão um resultado de  $(-R_g^2/3)$  e  $(-R_c^2/2)$ , respectivamente.<sup>72</sup>

$$\ln I = \ln I(0) - \frac{1}{2} q^2 R_c^2 \quad (4.2)$$

A análise de Kratky foi empregada assumindo que a conformação globular segue a lei de Porod ( $I(q) \propto q^{-4}$ ) a ângulos maiores, enquanto que o espalhamento do confôrmero de proteína expandida é proporcional a  $q^{-2}$  a valores moderados de  $q$  e, portanto, proporcional a  $q^{-1}$ .<sup>73</sup> Estas análises (Kratky e Guinier) são realizadas a diferentes concentrações de proteína e reticulante, e a partir da análise conjunta dos resultados, decorrem informações úteis sobre o sistema.

#### 4.3 Resultados e Discussão

Os dados de espalhamento para suspensões de gliadina nativa a diferentes concentrações podem ser visualizados nas Figuras 4.1A e 4.1B. Para a análise de Guinier a diferentes concentrações, a inclinação e o intercepto foram calculados a partir da estreita faixa de Guinier.<sup>74</sup>

Embora esta aproximação de Guinier seja somente válida quando  $qR_g = 1$ , no presente estudo, todos os limites teóricos para  $R_g$  apresentaram valores menores que  $0,02 \text{ nm}^{-2}$  (Figura 4.1A). Entretanto, na Figura 4.1B ( $\ln(Iq)$  vs  $q^2$ ) foi observada uma região linear indicando que todos os valores de  $R_c$  calculados situaram-se dentro da faixa de Guinier. Para melhor

ilustrar tais resultados, todos os limites para a aproximação da secção transversal válidos ( $qR_c = 1$ ) estão indicados por setas na Figura 4.1B.

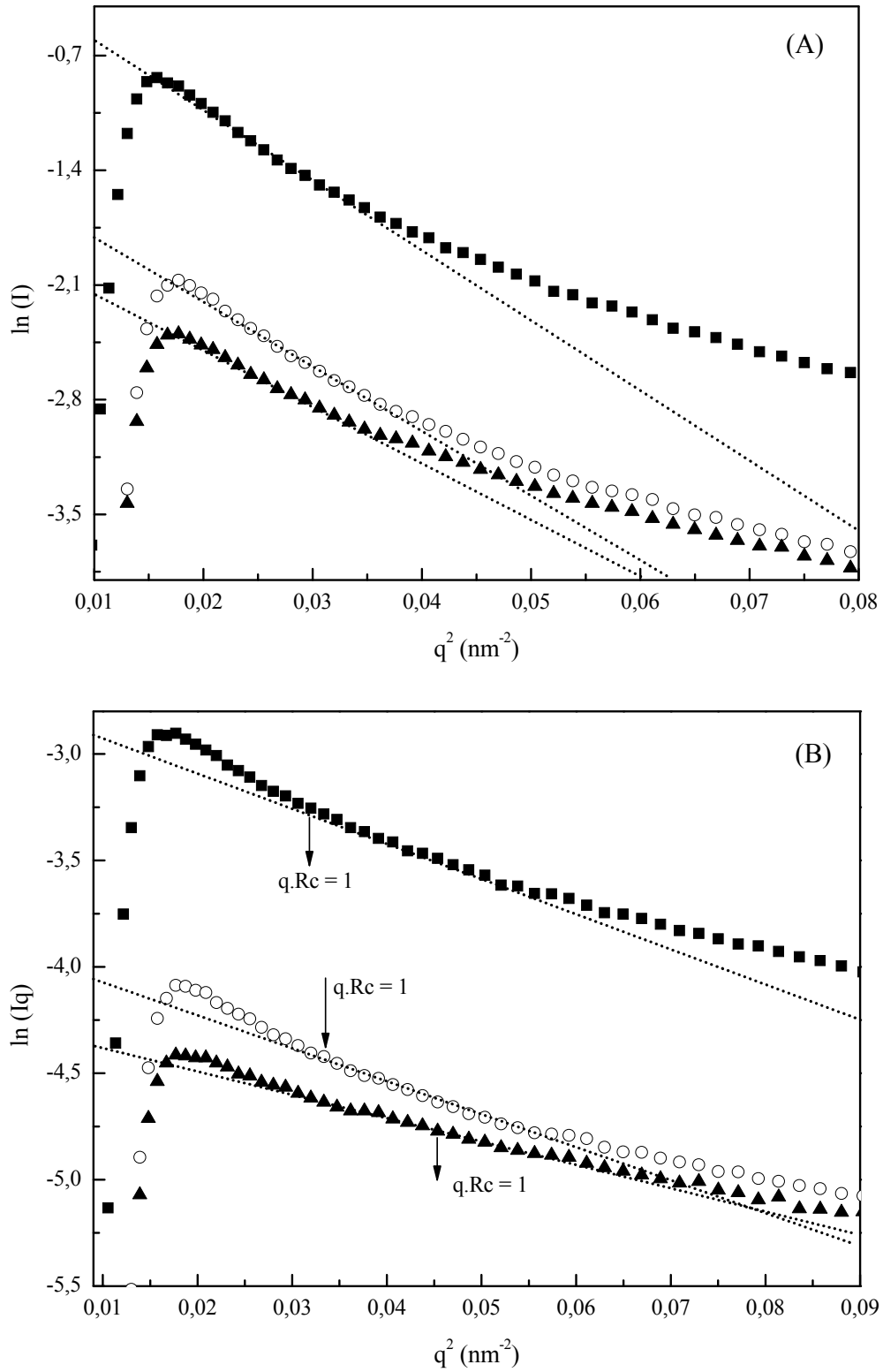


Figura 4.1 - (A) Análise de Guinier para obtenção de  $R_g$  e (B) secção transversal ( $R_c$ ) em suspensões

de gliadina nas concentrações: (■)100, (○) 50 e (▲) 25 mg mL<sup>-1</sup>.

Os valores de  $R_g$  e  $R_c$  calculados considerando os ajustes indicados anteriormente podem ser melhor visualizados na Figura 4.2, onde são apresentados os valores dos raios em função da presença do glicerol como plastificante.

Aparentemente, o efeito da variação da concentração de gliadina não foi significativo. Por outro lado, o efeito da adição do plastificante parece ter contribuído de maneira significativa para maiores valores de  $R_c$  e  $R_g$  e a variação destes raios na presença de glicerol pode estar indicando diferenças na agregação das proteínas em suspensão.<sup>75</sup> Este comportamento corrobora com o fato dos plastificantes serem conhecidos como agentes capazes de reduzir a interação proteína-proteína aumentando a mobilidade da cadeia polimérica e, desta forma, aumentando o volume livre. Ao agir desta forma, o plastificante permite novos rearranjos da estrutura de gliadina e, como consequência, variações na forma de seus agregados.<sup>76</sup>

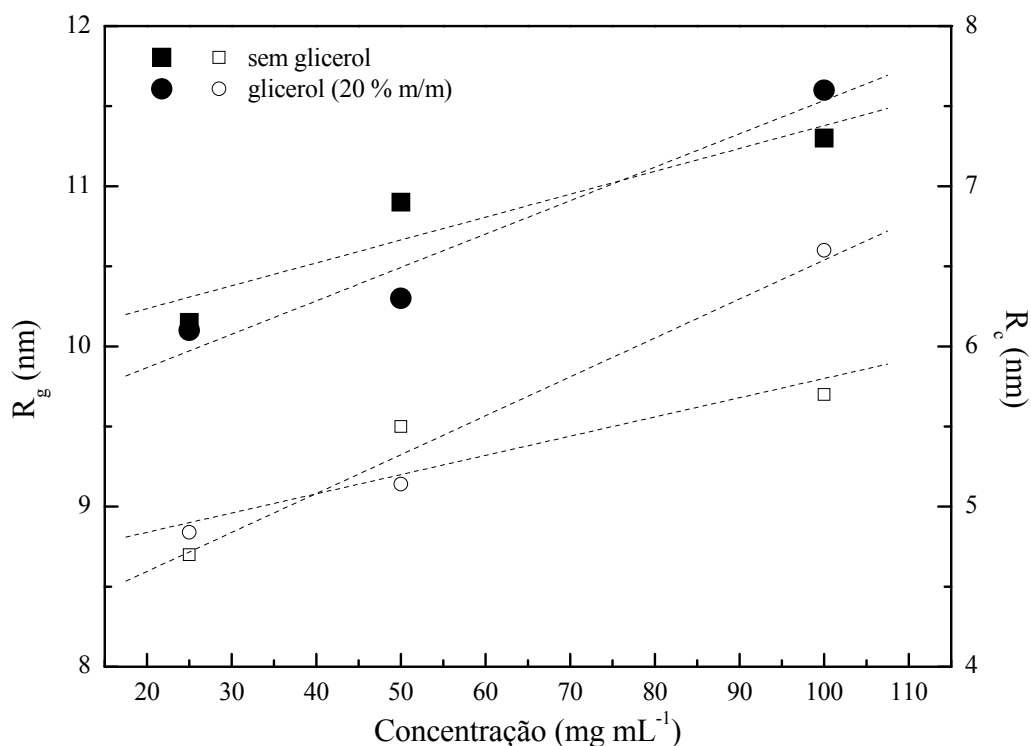


Figura 4.2 -  $R_g$  (símbolos fechados) e  $R_c$  (símbolos abertos) para suspensões de gliadina a diferentes concentrações com e sem a adição de plastificante.

Numa segunda etapa, partindo-se para os sistemas de suspensões reticuladas os

resultados das análises de Guinier podem ser visualizados na Figura 4.3.

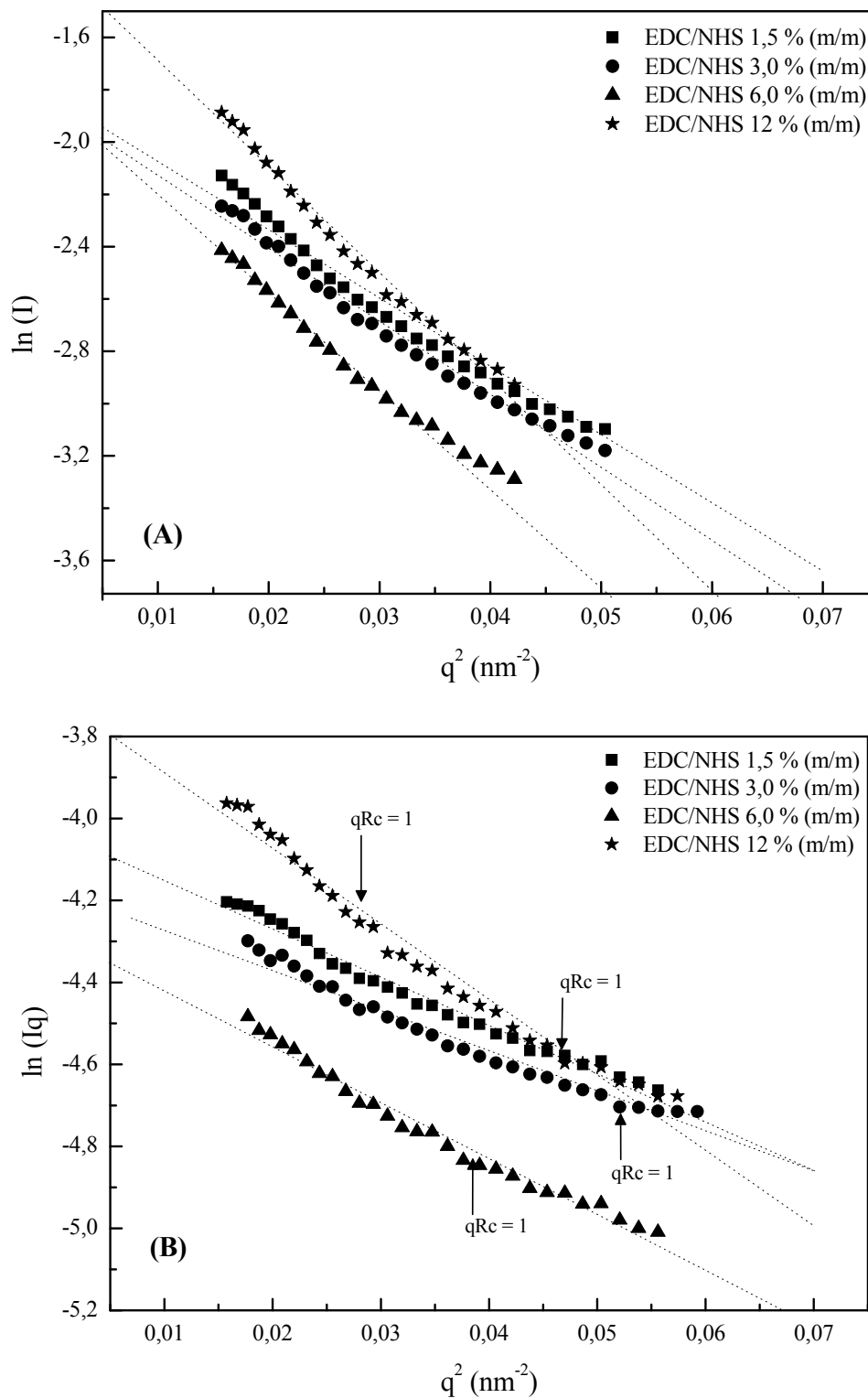


Figure 4.3 - (A) Análise de Guinier para obtenção de  $R_g$  e (B) e da secção transversal ( $R_c$ ) em suspensões de gliadina ( $100 \text{ mg mL}^{-1}$ ) reticuladas por [EDC/NHS] nas concentrações: (■) 1.5 (♦) 3.0 (▲) 6.0 e (\*) 12 % (m/m de gliadina). Todos os limites da secção transversal válidos ( $qR_c = 1$ ) são indicados no gráfico.



Para as inclinações de Guinier, é sabido que a presença de “ruídos” é um forte indicativo de estimativas não confiáveis,<sup>74</sup> neste contexto, a iminente linearidade nos resultados para os sistemas de gliadina reticulada por [EDC/NHS] serve somente como indicativo da presença de amostras monodispersas (Figura 4.3B).

Com relação à concentração do reticulante, quando 3,0 % de [EDC/NHS] são adicionados a suspensão, observa-se um aumento nos limites de Guinier que pode ser claramente observado na Figura 4.3B pela definição  $qR_c = 1$ . Este resultado parece não ter qualquer relação com a monodispersidade das amostras, uma vez que foram observadas regiões lineares e sem ruídos para todas as faixas de concentração de [EDC/NHS] empregadas.

O mecanismo de reticulação do [EDC/NHS] na estrutura da gliadina parece ter uma estreita relação com a conformação dos grupos carboxila dissociados na molécula de proteína.<sup>77</sup> Além disso, parece também depender da concentração de [EDC/NHS] adicionada à suspensão. Em suma, pode-se inferir que os fatores acima citados podem ter influenciado de alguma forma os valores de  $R_c$ , os quais provavelmente refletem a formação de diferentes tipos de agregados em suspensão.

Os maiores limites na faixa de Guinier foram observados a 3,0 % de [EDC/NHS], e, por esta razão, escolheu-se esta mesma quantidade de reticulante para avaliar o efeito de diferentes concentrações de proteína e, adicionalmente, o efeito da adição de glicerol.

A Figura 4.4 mostra que a gliadina reticulada e sem adição de glicerol apresenta uma elevação nos valores de  $R_g$  à medida que a concentração de proteína aumenta. Por outro lado, este mesmo efeito somente foi observado para  $R_c$  a concentrações de gliadina na faixa situadas entre 25 mg mL<sup>-1</sup> e 50 mg mL<sup>-1</sup>. Ao atingirem-se concentrações maiores (100 mg mL<sup>-1</sup>) os valores de  $R_c$  retornam à faixa inicial (25 mg mL<sup>-1</sup>).

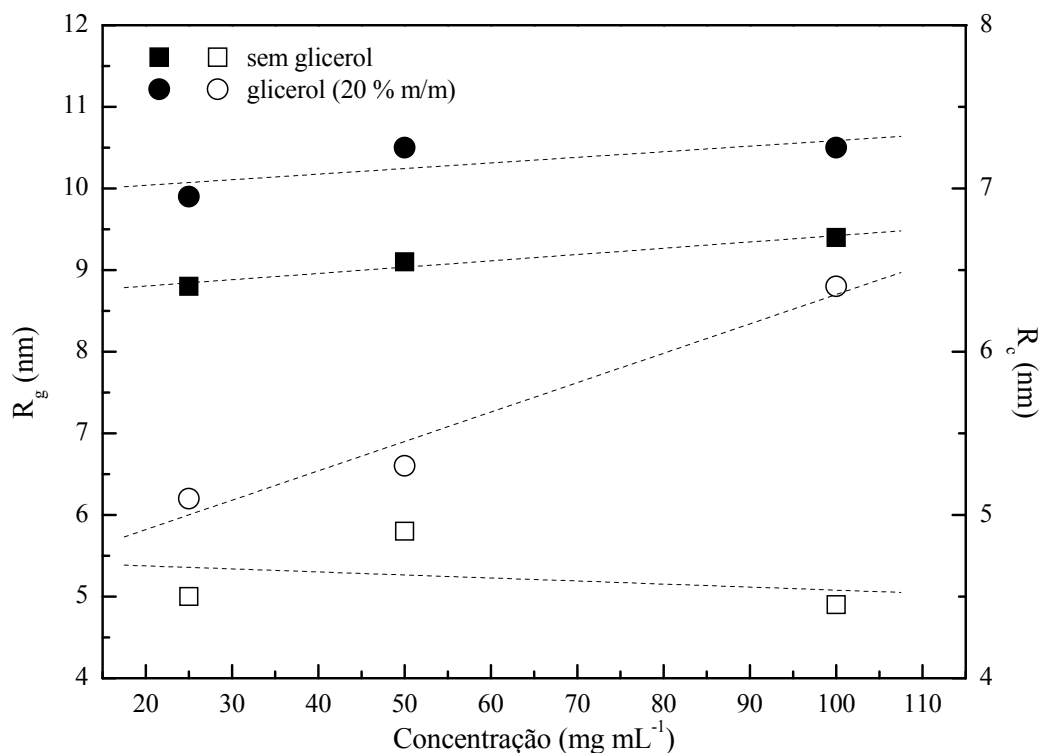


Figura 4.4 -  $R_g$  (símbolos fechados) e  $R_c$  (símbolos abertos) para suspensões de gliadina reticuladas por [EDC/NHS] (3,0 % , m/m de gliadina) a diferentes concentrações de proteína.

A análise de Guinier para as suspensões reticuladas com *L*-cisteína está ilustrada na Figura 4.5. As suspensões reticuladas apresentaram inclinações similares para toda a faixa de concentração de proteína, sugerindo apenas mudanças não significativas nos valores de  $R_g$  e  $R_c$ . A Figura 4.6 mostra os resultados obtidos para  $R_g$  e  $R_c$  na presença e ausência de glicerol como plastificante. Embora o efeito da adição de glicerol seja mais pronunciado no sistema não reticulado, a *L*-cisteína parece não ter inibido totalmente o aumento nos valores de  $R_g$  e  $R_c$  visto que a presença de plastificante no sistema gliadina/*L*-cisteína contribuiu para valores maiores de  $R_g$  e  $R_c$  quando comparado ao sistema sem plastificante.

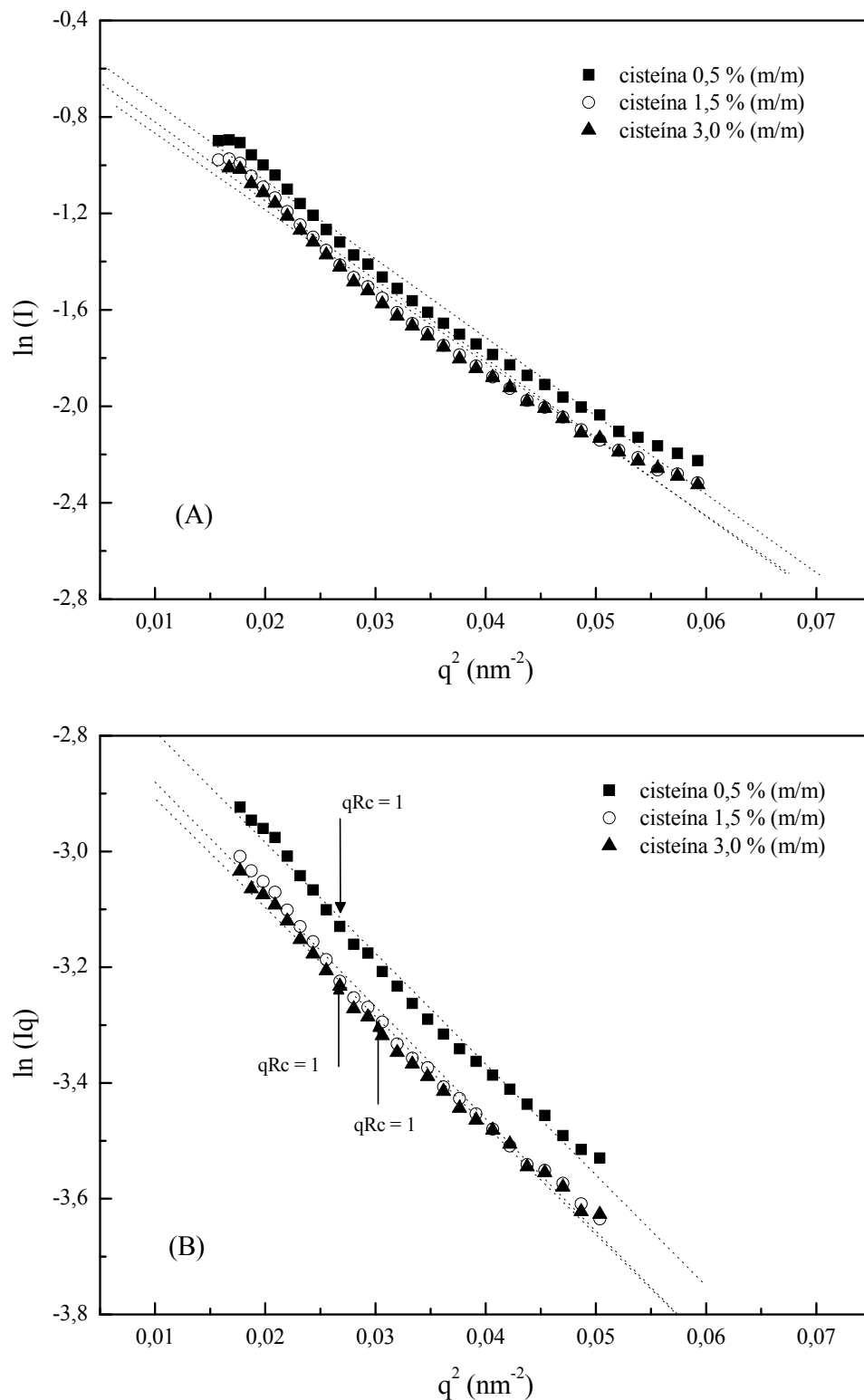


Figure 4.5 - (A) Análise de Guinier para obtenção de  $R_g$  e (B) secção transversal ( $R_c$ ) em suspensões de gliadina (100 mg mL<sup>-1</sup>) reticuladas por L-cisteína nas concentrações: (■) 0,5, (◊) 1,5 e (▲) 3,0 % (m/m de gliadina). Todos os limites de  $R_c$  ( $qR_c = 1$ ) válidos estão mostrados na figura.

A capacidade redutora da *L*-cisteína a torna capaz de clivar ligações S-S intracadeia promovendo novos rearranjos e permitindo que a proteína desdobre-se parcialmente formando novas pontes dissulfeto intermoleculares.<sup>59,78</sup> Estas mudanças estruturais parecem, portanto, ter sido influenciadas pela presença do glicerol, que por sua vez, pôde inibi-las através da redução das interações intra e intermoleculares.

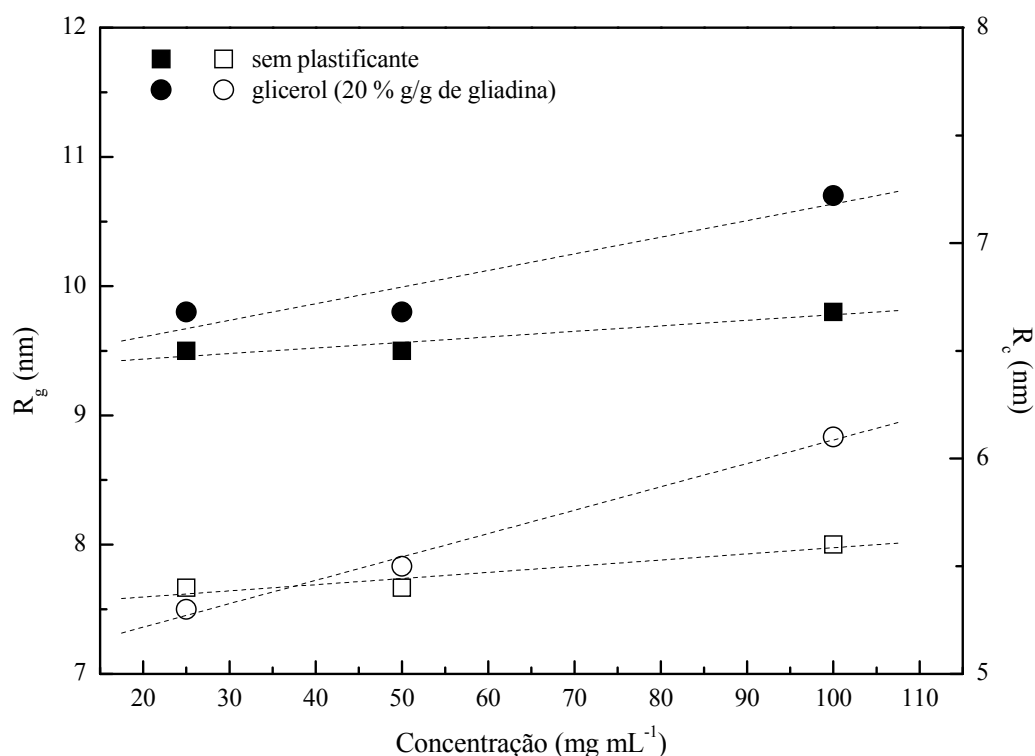


Figura 4.6 -  $R_g$  (símbolos fechados) e  $R_c$  (símbolos abertos) para suspensões de gliadina reticuladas pela *L*-cisteína (1,5% m/m de gliadina) a diferentes concentrações de proteína com e sem a adição de glicerol.

O efeito do glicerol em todos os sistemas utilizados no presente estudo pode ser também visualizado na Figura 4.7. Comparativamente, os valores de  $R_g$  na suspensão de gliadina nativa mostraram maior dependência do conteúdo de plastificante do que os valores de  $R_c$ . Este mesmo comportamento pôde ser observado para os dois sistemas reticulados.

Para o sistema gliadina/*L*-cisteína foi observado um pequeno aumento nos valores de  $R_c$  a 5 % de glicerol seguido por um platô e então, acima de 15 % de plastificante, os valores de  $R_c$  novamente decaem para os valores iniciais alcançados a 5 % de glicerol. As mudanças estruturais neste sistema parecem ter sido evidenciadas pela conformação estável na faixa

situada entre 5 e 15 % de plastificante, faixa de concentração na qual o raio de giro da secção transversal permanece praticamente inalterado.

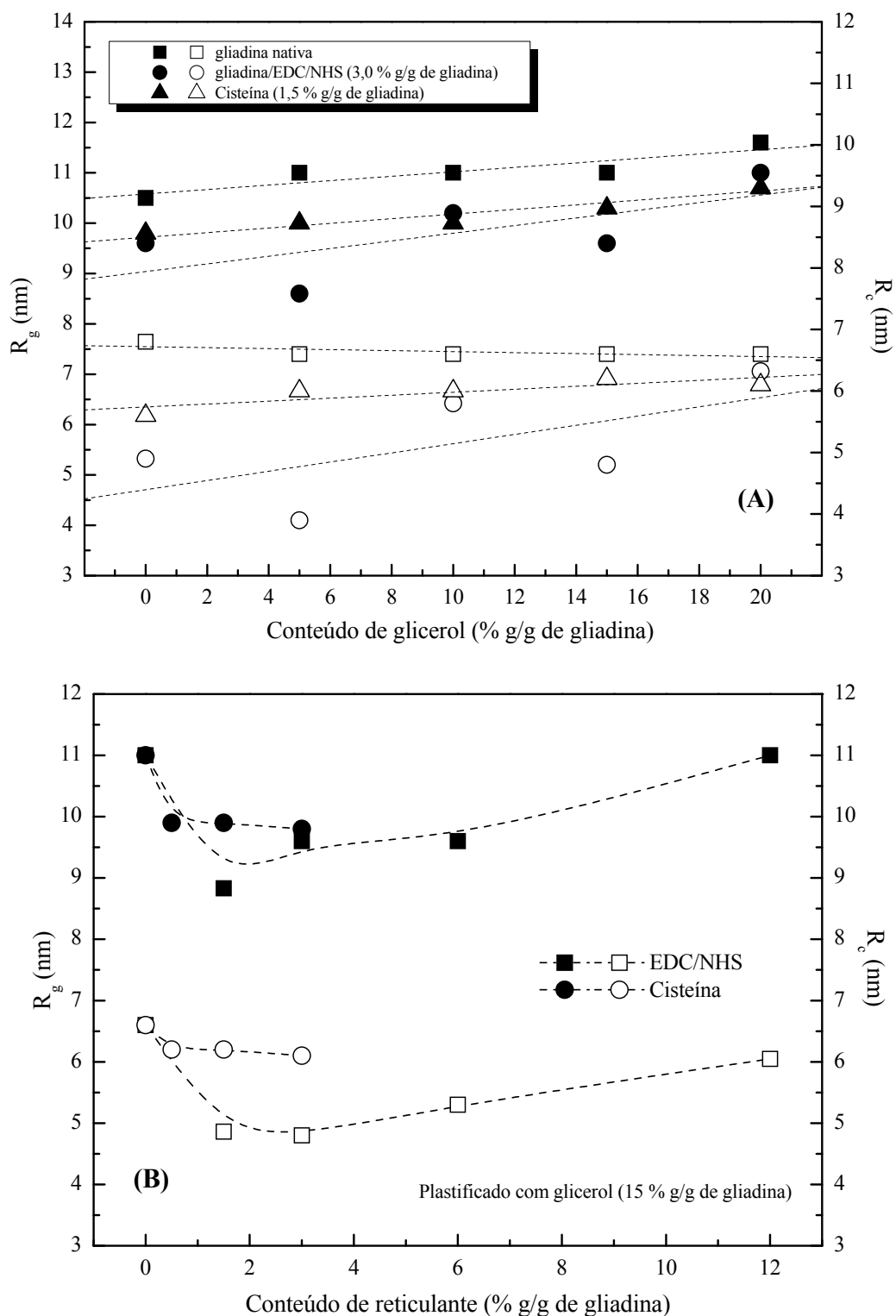


Figura 4.7 - (A) Dependência do plastificante (B) e concentração de reticulante nos valores de  $R_g$  (símbolos fechados) e  $R_c$  (símbolos abertos) para as suspensões de gliadina ( $100 \text{ mg mL}^{-1}$ ).

Uma hipótese levantada para este comportamento é a de que nesta faixa de plastificante situada entre 5-15 %, apenas uma quantidade restrita de glicerol é capaz de interpenetrar na conformação global da proteína. Parte desta limitação deve-se aos pontos de reticulação promovidos pela *L*-cisteína. Ainda assim, o pequeno aumento do volume livre permite que uma quantidade limitada de plastificante preencha o espaço interno da proteína, contribuindo para a pequena elevação nos valores de  $R_c$ .

Diferentemente do sistema citado, a influência do plastificante para o sistema gliadina/[EDC/NHS] foi capaz de promover oscilações nos valores de  $R_g$  e  $R_c$  à medida que a concentração de glicerol aumentava (Figura 4.7A). Traçando-se uma analogia ao sistema gliadina/*L*-cisteína, a modificação química promovida por [EDC/NHS] parece ter sofrido influência do glicerol de uma maneira distinta. A presença de glicerol no sistema gliadina/[EDC/NHS] foi capaz de provocar mudanças nas forças intermoleculares, as quais induziram a proteína à acessibilidade dos grupos carboxílicos presentes em sua estrutura, à reação de reticulação. Este comportamento, embora instável, pôde ser comprovado pelas mudanças nos valores de  $R_c$  e  $R_g$ .

Com relação à dependência de  $R_g$  e  $R_c$  às concentrações de reticulante, a Figura 4.7B mostra que a adição da concentração inicial de 0,5% de *L*-cisteína no sistema gliadina/*L*-cisteína, induziu a redução nos valores de  $R_g$  e  $R_c$  quando comparado ao sistema não reticulado. No entanto, este aumento inicial manteve-se inalterado a concentrações maiores de reticulante (1,5 e 3,0%), ou seja, as associações promovidas pela *L*-cisteína no empacotamento da molécula de proteína parecem não ter sofrido alterações significativas mesmo a concentrações maiores de *L*-cisteína.

Baseando-se nestes resultados, pôde-se sugerir que as mudanças nos microagregados promovidas pelos resíduos de *L*-cisteína através da clivagem das ligações dissulfeto intracadeia foram de fato promovidos. No entanto, quando o maior número possível de ligações dissulfeto são clivadas nas cadeias de gliadina, quantidades superiores de reticulante não são capazes de promover rearranjos adicionais via reações de troca nos grupos dissulfeto/sulfidril presentes na proteína.

O sistema gliadina/[EDC/NHS] mostrou que concentrações mínimas de [EDC/NHS] (3,0 %) reduziram os valores de  $R_g$  e  $R_c$ , porém, acima de 6,0 % houve um aumento nos raios até que concentrações maiores de [EDC/NHS] (12 %) fossem alcançadas. Este comportamento parece ter indicado certa dependência de  $R_g$  e  $R_c$  com a concentração de reticulante.

De modo bastante sugestivo, pôde-se observar que embora por mecanismos distintos, as reações de reticulação promovidas pelo [EDC/NHS] e pela *L*-cisteína foram capazes de alterar os valores de  $R_g$  e  $R_c$ . Adicionalmente, estas mudanças também podem sugerir a eventual formação de agregados na estrutura da proteína ou mesmo mudanças na conformação globular da proteína. No entanto, a simples obtenção destes parâmetros não contribui significativamente para conclusões a este respeito, por esta razão, uma segunda metodologia já utilizada em diversos trabalhos foi empregada.<sup>73,79-82</sup> A metodologia ou análise de Kratky é uma ferramenta bastante útil capaz de revelar de maneira geral o possível desenovelamento da proteína nativa e também reticulada.

A análise de Kratky para a suspensão de gliadina não reticulada e para o sistema gliadina/*L*-cisteína (Figura 4.8A) mostrou curvas indicativas de uma proteína com padrões globulares evidenciados pela presença de picos máximos a valores de  $q = 0,1407 \text{ nm}^{-1}$  para a gliadina não reticulada e  $q = 0,1598 \text{ nm}^{-1}$  para a o sistema gliadina/*L*-cisteína. As diferenças nos valores de  $q$  máximos podem ser um indicativo de que as estruturas assumem diferentes conformações, o que de fato estaria contribuindo para as pequenas diferenças observadas nos valores de  $R_g$ , conforme comentado na Figura 4.7.

Enquanto a gliadina não modificada apresentou seu  $R_g$  em torno de 11,3 nm; o raio de giro para o sistema gliadina/*L*-cisteína foi de 9,8 nm. Cabe ressaltar que estas curvas de espalhamento de estruturas globulares seguem a lei de Porod onde,  $I(q) \propto q^{-4}$ , a valores mais elevados de  $q$ , enquanto que o espalhamento para estruturas não globulares é proporcional a  $q^{-2}$  a valores de  $q$  moderados e, portanto, proporcionais a  $q^{-1}$ .<sup>83-85</sup>

O fato da gliadina não modificada apresentar um perfil de curva semelhante àquele do sistema gliadina/*L*-cisteína, pode ser sugestionado, pelo modo como as amostras foram preparadas (item 4.1.2) uma vez que as suspensões de gliadina foram aquecidas a 55 °C e mantidas a esta temperatura por alguns minutos de maneira a facilitar a solubilização da proteína.

Este processo, juntamente com a mudança de pH (10-11), pode ter contribuído para variações na conformação da gliadina, já que o aquecimento e variações de pH acima ou abaixo do ponto isoelétrico da proteína são capazes de promover a desnaturação protéica.<sup>69,86</sup>

De maneira interessante, o sistema gliadina/[EDC/NHS] exibiu um padrão característico de proteína com certo grau de desnaturação evidenciado pela ausência de um pico máximo, o que denota certo padrão de curva praticamente inalterado para todos os

valores de  $q$  empregados.

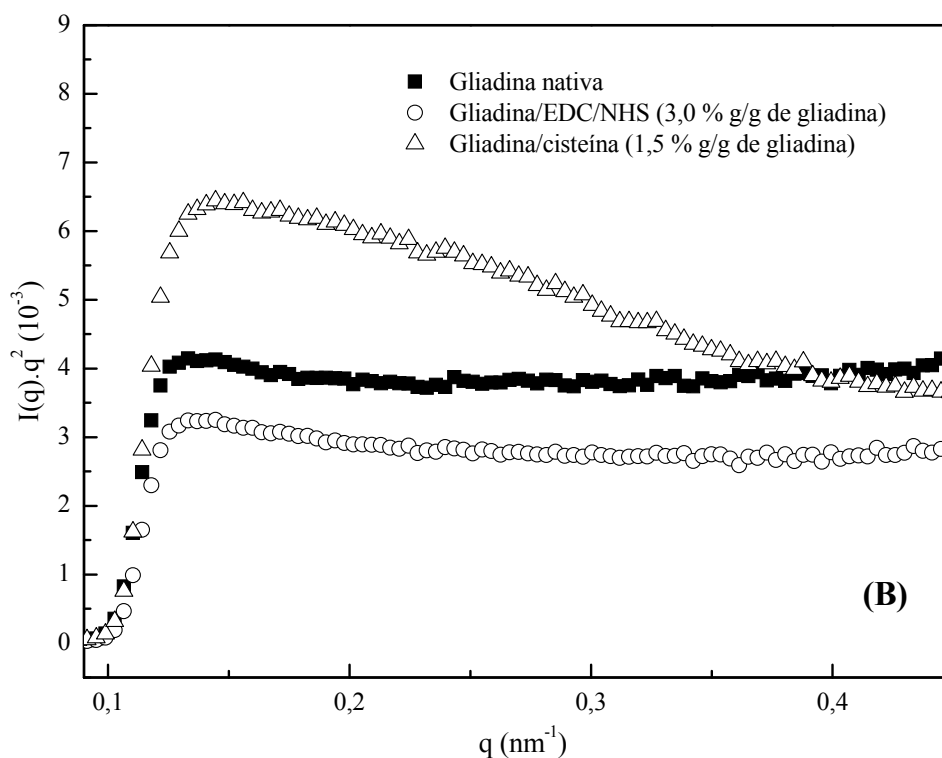
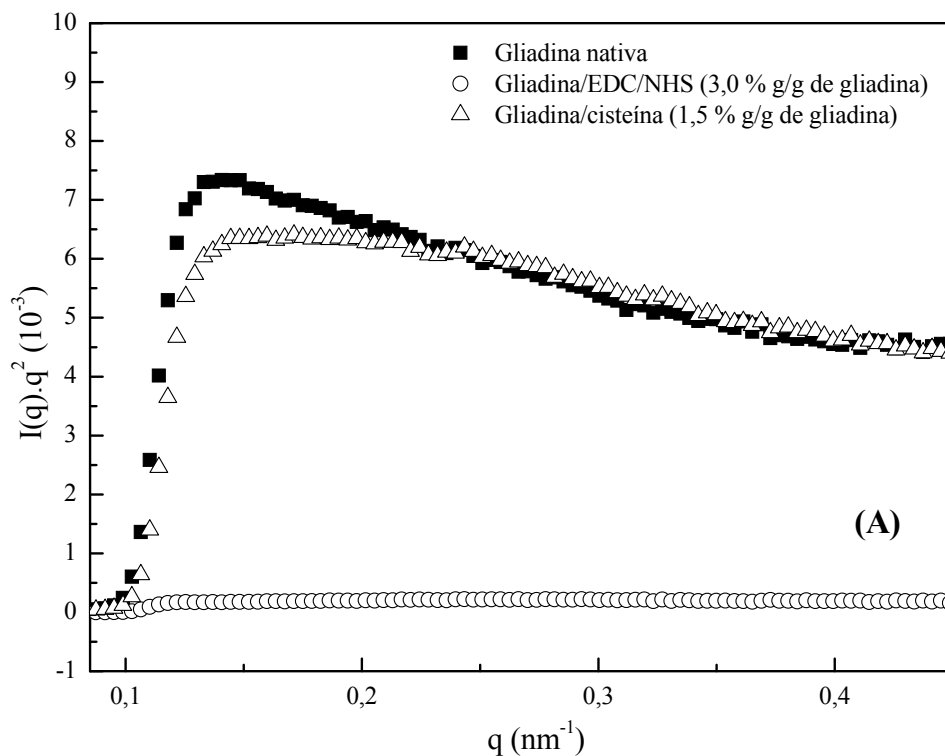


Figura 4.8 – Análise de Kratky para suspensões de gliadina ( $100 \text{ mg mL}^{-1}$ ) a  $25^\circ\text{C}$ : (A) sem glicerol e (B) com glicerol ( $15 \text{ \% m/m}$  de proteína).

Este perfil de espalhamento parece ser uma indicação de uma grande extensão de desordenamento adquirida pela estrutura da proteína. Em outras palavras, a forma da cadeia



polipeptídica, neste caso, assume uma conformação inteiramente aleatória, comportamento oposto aquele observado para os sistemas anteriores.<sup>73,74,80</sup>

Curiosamente, na presença de glicerol (Figura 4.8B) mudanças no perfil das curvas foram observadas. Embora mantendo um perfil característico de estrutura globular, os valores de  $q$  máximos para o sistema contendo gliadina nativa ( $q = 0,1331 \text{ nm}^{-1}$ ) e para o sistema gliadina/*L*-cisteína ( $q = 0,1445 \text{ nm}^{-1}$ ) foram alterados. Além disso, a posição dos picos sofreu uma inversão, revelando que o sistema gliadina/cisteína parece ter sido sofrido influência da presença de glicerol, o qual contribuiu para a manutenção de seu padrão de estrutura globular numa extensão maior quando comparado ao sistema de gliadina não reticulada.

Para o sistema gliadina/[EDC/NHS], a influência do plastificante também parece ter contribuído para de sua estrutura globular. De maneira geral, comparando-se as três curvas observadas para os diferentes sistemas analisados, foram observadas diferenças nas curvas de espalhamento entre os três sistemas, quanto à posição exata dos picos e suas alturas. De acordo com Konno,<sup>73</sup> este comportamento elucida diferenças quanto à massa molar,  $R_g$  e conformação da proteína.

Com base nesta afirmação do autor<sup>73</sup> e sabendo-se de antemão que uma das formas de se confirmar o processo de reticulação é através do aumento da massa molar,<sup>87</sup> a análise de Kratky parece ter contribuído de maneira qualitativa para a confirmação do processo de reticulação nos dois sistemas estudados. Com relação a estes sistemas discussões mais abrangentes são realizadas a seguir.

O resultado da análise de Kratky para os sistemas acrescidos de diferentes concentrações de reticulantes estão mostrados nas Figuras 4.9 e 4.10. Conforme comentado anteriormente, de fato a adição de *L*-cisteína parece ter resultado em mudanças na conformação global da proteína, não obstante, as diferenças no perfil das curvas, relacionadas à variação de *L*-cisteína nas suspensões pôde ser sentida somente a 0,5 % (m/m de gliadina). Nesta faixa de concentração, as associações promovidas pela *L*-cisteína parecem ter contribuído de maneira efetiva para o empacotamento das moléculas. Este fato corrobora com a idéia de que o grau e extensão destas associações ou rearranjos parecem ser independentes da concentração de *L*-cisteína, uma vez que os valores de  $R_g$  e  $R_c$  permaneceram inalterados mesmo a concentrações maiores de *L*-cisteína. Além disso, a forma globular parece ter sido mantida para toda a faixa de concentração utilizada, evidenciando uma conformação estável e somente parcialmente desdobrada.

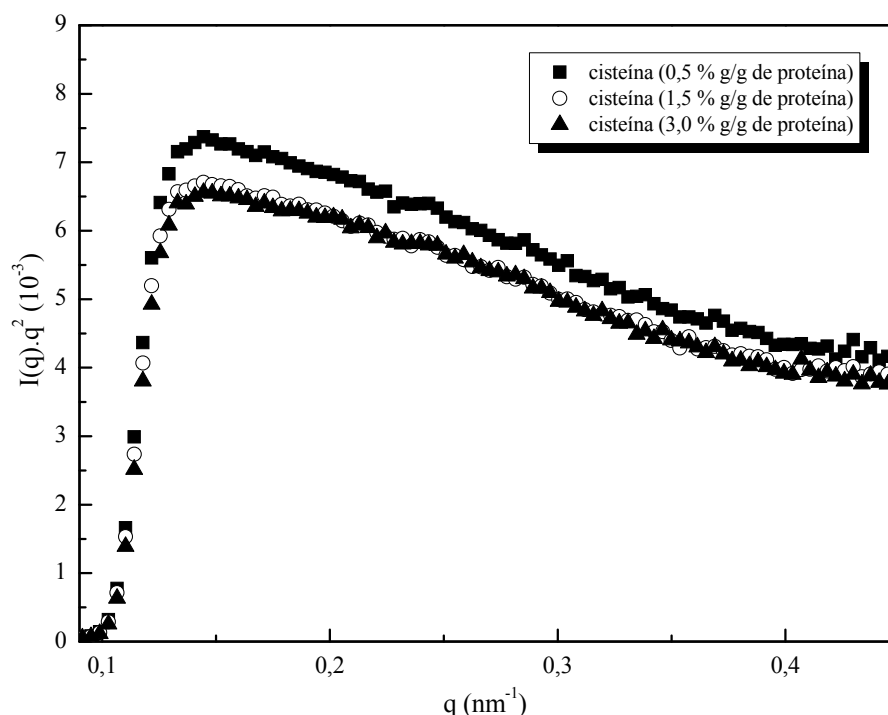


Figura 4.9 - Análise de Kratky nas suspensões de gliadina ( $100 \text{ mg mL}^{-1}$ ) a  $25^\circ\text{C}$  reticuladas com diferentes concentrações de L-cisteína. As concentrações empregadas estão demonstradas na figura.

A análise de Kratky para o sistema gliadina/[EDC/NHS] mostra que o aumento na concentração do reticulante causou alterações na altura das curvas (Figura 4.10). Estas mudanças foram refletidas na intensidade das curvas, as quais foram reduzidas à medida que se aumentou a concentração de [EDC/NHS] nos sistemas. No entanto, quando empregada a concentração de 12 % (m/m) de reticulante, uma alteração significativa na altura da curva foi observada. Com relação a este fato, observações pertinentes foram realizadas com base na comparação entre os dois agentes de reticulação empregados e estas são discutidas a seguir.

Comparando-se os diferentes reticulantes pode-se sugerir que o perfil globular foi mantido numa maior extensão para o sistema gliadina/L-cisteína. Com relação a este fato, ressalva-se a diferença da natureza das ligações envolvidas no processo de reticulação.

A conformação do sistema gliadina/L-cisteína é uma consequência de ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas, atrações eletrostáticas e ligações dissulfeto intra e intermoleculares. No entanto, parece não ser dependente da concentração de L-cisteína utilizada e uma vez alcançada a estabilidade parece não ocorrer mudanças conformacionais adicionais. Por outro lado, o mecanismo de reticulação do sistema gliadina/[EDC/NHS] é o

reflexo de grupos carboxílicos disponíveis para que a reação ocorra. Além disso, ao contrário do sistema gliadina/*L*-cisteína, foi demonstrado que o sistema gliadina/[EDC/NHS] possui certa dependência da quantidade de reticulante, haja vista as mudanças nos tamanhos de  $R_g$  e  $R_c$  a concentrações maiores de [EDC/NHS]. Entretanto, a estrutura reticulada resultante pode ser instável, e neste caso, um intermediário *O*-acilisourea amino reativo, susceptível a hidrólise pode ser formado e contribuir para o maior desenovelamento da molécula. No presente estudo, a adição de NHS ao sistema foi realizada a fim de se estabilizar este possível intermediário impedindo que estas reações ocorressem, todavia, a extensão desta eficiência não foi analisada e necessita de estudos complementares.

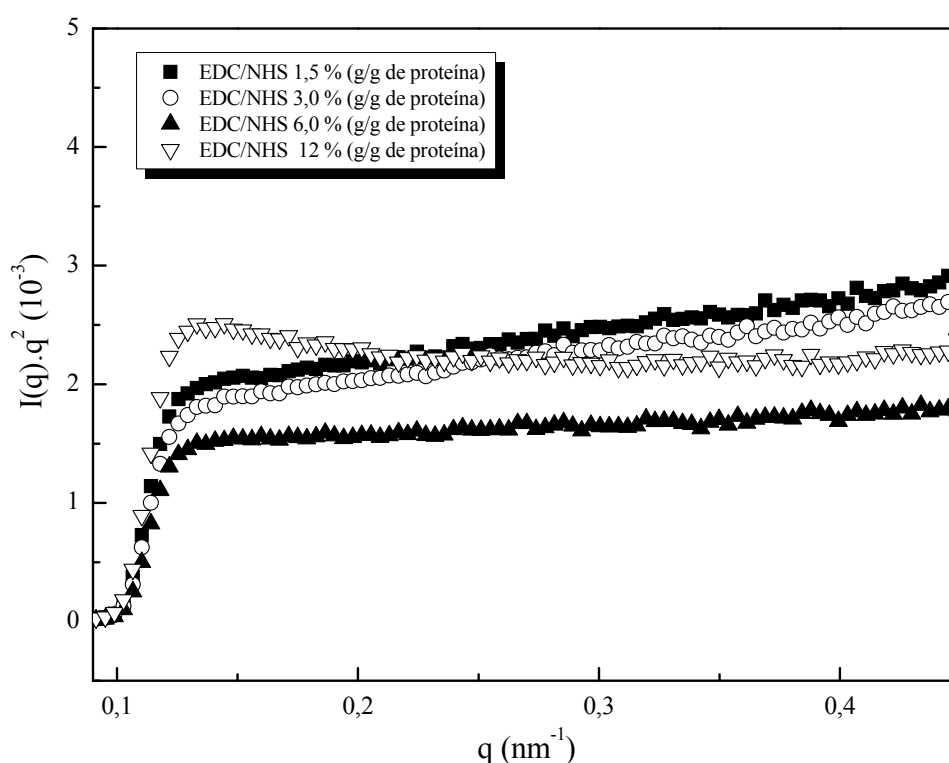


Figura 4.10 – Análise de Kratky nas suspensões de gliadina ( $100 \text{ mg mL}^{-1}$ ) a  $25^\circ\text{C}$  e reticuladas com diferentes quantidades de [EDC/NHS]. As concentrações empregadas estão demonstradas na figura.

#### 4.4 Conclusões Parciais

No presente estudo, a técnica de espalhamento de raios X a baixos ângulos (SAXS) mostrou ser uma importante ferramenta na investigação de suspensões de gliadina nativa e modificada pela presença dos reticulantes [EDC/NHS] e *L*-cisteína. A análise de Guinier mostrou que os tamanhos de  $R_g$  e  $R_c$  para gliadina não modificada situaram-se na faixa entre 10 - 11,6 e 4,7 - 6,6 nm, respectivamente. Enquanto que o sistema gliadina/[EDC/NHS] revelou tamanhos menores de  $R_g$  (entre 8,8 - 11nm) e valores de  $R_c$  similares aos observados para o sistema não reticulado (4,5 – 6,3). O sistema gliadina/*L*-cisteína apresentou tamanhos de  $R_g$  menores (9,5 e 10,7 nm) quando comparado ao sistema não reticulado, porém tamanhos de  $R_c$  um pouco maiores (5,4 e 6,1) quando comparados ao sistema gliadina/[EDC/NHS].

As variações referentes a estes valores deram-se devido à presença de plastificante e, nos casos dos sistemas reticulados, também devido à presença de [EDC/NHS] e *L*-cisteína. De forma geral, a presença do glicerol e variações em sua concentração parecem ter exercido um papel importante para que o processo de reticulação fosse mais efetivo.

A análise de Kratky confirmou que as suspensões de gliadina não modificadas e os dois sistemas reticulados tiveram suas estruturas parcialmente desenoveladas, porém ainda com manutenção de sua forma globular, principalmente no sistema gliadina/*L*-cisteína. No entanto, o sistema gliadina/[EDC/NHS] na ausência de plastificante, mostrou um quase completo desenovelamento em sua forma global, o que denota uma configuração aleatória e, demonstra mais uma vez a influência do glicerol no processo de reticulação.

## CAPÍTULO 5

---

### **PROPRIEDADES VISCOELÁSTICAS DE SUSPENSÕES DE GLIADINA: EFEITO DA ADIÇÃO DE GLICEROL COMO PLASTIFICANTE E DOS PROMOTORES DE RETICULAÇÃO L-CISTEÍNA E HIDROCLORETO DE 1-(3-DIMETILAMINO PROPIL-3-ETIL-CARBODIIMIDA)/N-HIDROXISUCCINAMIDA/[EDC/NHS]**

#### *5.1 Resumo*

No presente capítulo, foram estudadas as propriedades viscoelásticas de suspensões de gliadina preparadas com a adição de diferentes concentrações dos agentes de reticulação [EDC/NHS] e L-cisteína, na presença e na ausência de plastificante. Nos experimentos em domínio linear, foram obtidas curvas de viscosidade para os sistemas nativos e reticulados em função da concentração de glicerol como plastificante. Os experimentos oscilatórios permitiram a obtenção dos parâmetros  $G'$  (módulo de estocagem ou módulo elástico),  $G''$  (módulo de perda) e  $\tan \delta$  ( $G''/G'$ ). Estes parâmetros, além de serem fundamentais para o monitoramento das suspensões em condições isotérmicas, também auxiliaram no entendimento do processo de reticulação. A variação de concentração tanto de L-cisteína quanto [EDC/NHS], perante ausência e presença de glicerol, permitiu considerar a influência do plastificante na velocidade de reticulação e a dependência do tempo para que a reticulação se dê de maneira mais ou menos efetiva. As informações contidas neste capítulo levam ao melhor entendimento do comportamento das suspensões tanto em função da presença de plastificante quanto em função de diferentes agentes de reticulação. Além disso, os diferentes mecanismos de reticulação tornam-se evidentes mediante obtenção dos parâmetros reológicos e, desta forma, permitem as prováveis interações moleculares ao longo do processo de modificação química em suspensão.

#### *5.2 Procedimento Experimental*

##### *5.2.1 Material*

A descrição do material utilizado neste capítulo bem como o preparo das suspensões de proteína pode ser encontrada nos itens 4.1.1 e 4.1.2 do capítulo 4.

### 5.2.2 Reologia

As propriedades reológicas para as suspensões de gliadina foram realizadas em um reômetro (AR 1000, TA Instruments, New Castle, DE, USA). Todos os experimentos foram realizados a 55 °C utilizando um sistema de circulação para controle de temperatura e geometria de cilindros concêntricos (60 mm) com espaçamento de 1 mm. Este espaçamento foi constante para todas as medidas.

Previamente às medidas para obtenção de parâmetros reológicos dinâmicos, foram conduzidos experimentos variando-se a tensão para assegurar que todas as análises seriam realizadas no domínio viscoelástico linear. Os experimentos oscilatórios foram realizados para determinação do módulo de armazenamento ( $G'$ ), de perda ( $G''$ ) e de  $\tan \delta$  em função do tempo, nas suspensões de gliadina nativa e reticulada, na presença e na ausência de glicerol como plastificante. A tensão e a frequência utilizadas foram 5.000 Pa e 10 Hz, respectivamente.

As medidas para obtenção de parâmetros reológicos não lineares foram conduzidas na faixa de cisalhamento de 0,1 até 1000 s.<sup>-1</sup>

Para os ensaios no módulo não linear, as suspensões de gliadina com e sem reticulante na presença e ausência de plastificante foram identificadas de acordo com a Tabela 5.1, a fim de facilitar a leitura dos resultados. Cabe lembrar que neste ensaio a proporção de reticulante, quando presente, manteve-se fixa (3,0 % para [EDC/NHS] (m/m de gliadina) e 1,5 % para *L*-cisteína (m/m de gliadina), enquanto que a proporção de plastificante sofreu variações em sua concentração entre 0 e 20 % (m/m de gliadina). Todos os ensaios reológicos foram realizados em duplicata.

As suspensões de proteína foram aquecidas até 55 °C e mantidas nesta temperatura por 5 minutos num banho termostatzado, sob agitação constante, antes de serem submetidas à análise pelo equipamento.

Tabela 5.1 - Identificação dos sistemas submetidos aos ensaios no domínio não linear com a proporção de cada componente adicionado às suspensões de gliadina reticuladas e não reticuladas na presença e ausência de glicerol como plastificante.

SISTEMAS		GLIADINA	GLICEROL	IEDC/NHSI	L-CISTEÍNA
A	1	100	0	*	*
	2	95	5	*	*
	3	90	10	*	*
	4	85	15	*	*
	5	80	20	*	*
B	1	97	0	2,19/1,11	*
	2	92.15	5	2.08/0.77	*
	3	87.4	10	1.9/0.7	*
	4	82.4	15	1.8/0.9	*
	5	77.6	20	1.7/0.8	*
C	1	98.5	0	*	1,5
	2	93.6	5	*	1.42
	3	88.65	10	*	1.35
	4	83.72	15	*	1.28
	5	78.8	20	*	1.2

### 5.2.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

A eletroforese em gel de poliacrilamida 12 % (m/v) foi realizada para as amostras de gliadina nativa e gliadina reticulada com L-cisteína em condições redutoras e não redutoras. A análise foi realizada de acordo com o procedimento utilizado por Laemmli<sup>88</sup> com modificações. Alíquotas de suspensão de gliadina reticulada e não reticulada foram diluídas em Tris-HCl 1,5 M (pH 8,8). Em seguida foram retiradas alíquotas as quais foram ressuspensas em 10 % de SDS e 10 % de persulfato de amônio. Alíquotas entre 0,5 e 15µM, todas em suspensão tampão-SDS 10 % e corrida em um dispositivo vertical para eletroforese em gel. Após a eletroforese o gel foi corado com Coomassie Brilliant Blue R-250.

#### 5.2.4 Grau de reticulação (% R)

As medidas para determinação dos grupos amino foram realizadas para a quantificação do grau de reticulação nas suspensões quimicamente tratadas por [EDC/NHS]. A metodologia utilizada baseia-se no procedimento descrito por Bubnis e Ofner <sup>89</sup> com pequenas modificações. Este método fundamenta-se na reação do ácido 2,4,6-trinitrobenzeno sulfônico (TNBS) com grupos amino primários presentes nas suspensões de gliadina. O número de grupos perdidos durante o processo de reticulação será equivalente a diferença entre o número de grupos não reticulados quimicamente tratados antes e depois da adição de [EDC/NHS].

Para a realização da análise foram pesados 5,5 mg de amostra em um tubo de ensaio e adicionados 0,5 mL de suspensão de NaHCO<sub>3</sub> 4 % e 0,5 mL de suspensão 0,5 % de TNBS e o posterior aquecimento a 40 °C por 4 horas.

Após este período, 1,5 mL de HCl 6 M foram adicionados e a mistura autoclavada por 1 hora a 120 °C. O produto hidrolisado foi diluído em água (2,5 mL) e extraído com 10 mL de éter etílico para remoção do excesso de TNBS. Tomou-se uma alíquota de 2,5 mL da fase aquosa e aqueceu-se por 30 minutos em um banho quente para remoção do éter residual. Em seguida, esta alíquota foi deixada para resfriar a temperatura ambiente e novamente diluída com 7,5 mL de água destilada.

A absorvância da suspensão foi medida a 346 nm utilizando-se um espectrômetro Perkin Elmer Lambda 11/Bio. O branco foi preparado conforme a descrição, porém adicionando-se HCl 6 M antes da adição de TNBS para inibição da reação deste com grupos amino. As medidas de absorvância foram realizadas em triplicata e os resultados finais foram obtidos convertendo-se os valores de absorvância para o número de grupos ε-amino/ g de amostra através da equação 5.1.

$$\text{Moles de } \epsilon\text{-amino/g} = \frac{2(\text{absorvância})(0,0010\text{L})}{(1,46 \times 10^{-4} \text{ L.mol}^{-1} .\text{cm}^{-1})(b)(x)} \quad (5.1)$$

Onde,  $1,46 \times 10^{-4} \text{ L.mol}^{-1} .\text{cm}^{-1}$  corresponde à absortividade molar do TNBS-lisina, b é o caminho ótico em cm, e x é a massa da amostra em gramas. A porcentagem de reticulação (% R) foi calculada em relação ao número de grupos ε-amino perdidos no processo de reticulação (Equação 5.2).



$$\% R = \frac{(\varepsilon - a \min o(N)) - (\varepsilon - a \min o(R) \times 100)}{\varepsilon - a \min o(N)} \quad (5.2)$$

Onde  $\varepsilon$ -amino(N) e  $\varepsilon$ -amino (R) são o número de grupos  $\varepsilon$ -amino livres nas suspensões com gliadina não reticulada e reticulada, respectivamente.

### 5.3 Resultados e Discussão

As propriedades viscoelásticas no domínio não linear podem ser visualizadas nas Figuras de 5.1 a 5.5. Em cada uma delas, pode ser observado o comportamento das suspensões de gliadina não reticulada (Sistema A) e as suspensões de proteína reticuladas com [EDC/NHS] (Sistema B) e *L*-cisteína (Sistema C). A ordem crescente na numeração das Figuras segue conforme a adição de glicerol às suspensões nas concentrações 0; 5; 10; 15 e 20 % (m/m de gliadina), respectivamente.

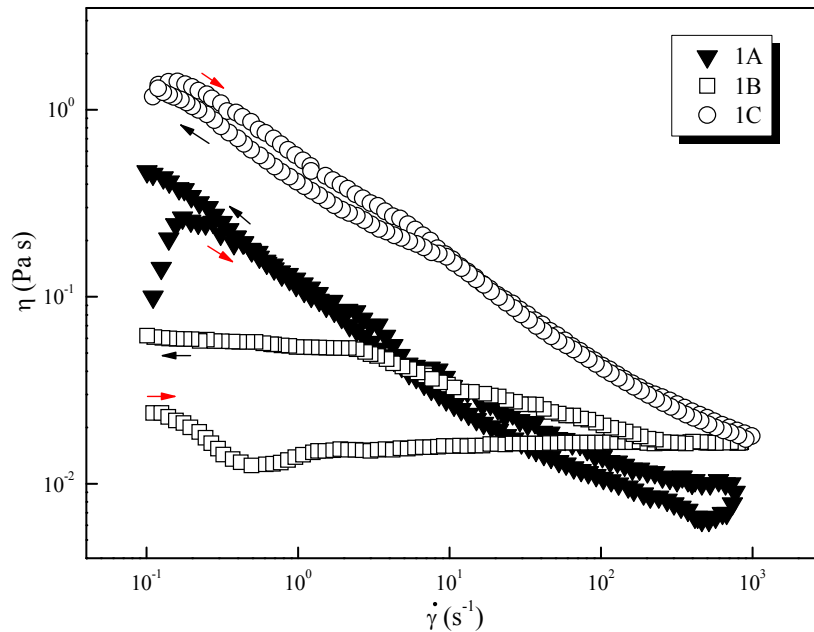


Figura 5.1 – Curvas de viscosidade em função da taxa de cisalhamento para suspensões de gliadina na ausência de glicerol. Sistema 1A: não reticulado; Sistema 1B: gliadina/[EDC/NHS] (3,0 % m/m de gliadina); Sistema C: gliadina/*L*-cisteína (1,5 % m/m de gliadina). As setas vermelhas e pretas indicam o sentido do início e final da análise, respectivamente.

A Figura 5.1 mostra todos os sistemas estudados na ausência de glicerol como

plastificante. De maneira geral, pode-se observar que o perfil das curvas de viscosidade para os sistemas A, B e C são semelhantes e apresentam seus valores marcadamente reduzidos com o aumento na taxa de cisalhamento; perfil este inerente a materiais pseudoplásticos (*shear-thinning*), caracterizados pela dependência da viscosidade em função do cisalhamento.

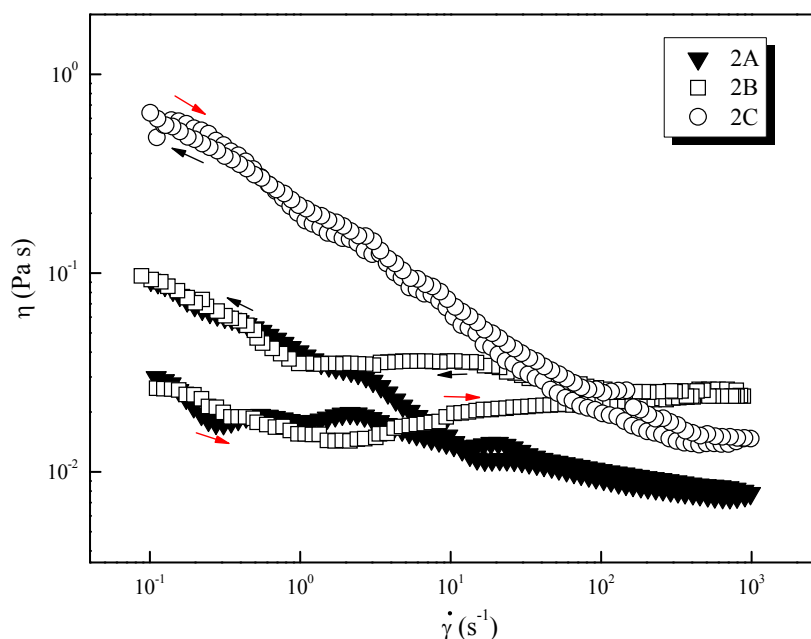


Figura 5.2 – Curvas de viscosidade em função da taxa de cisalhamento para suspensões de gliadina e glicerol (5 % m/m de gliadina). Sistema 2A: não reticulado; Sistema 2B: gliadina/glicerol/[EDC/NHS] (3,0 % m/m de gliadina); Sistema 2C: gliadina/glicerol/*L*-cisteína (1,5 % m/m de gliadina). As setas vermelhas e pretas indicam o sentido do início e final da análise, respectivamente.

Os menores valores de viscosidade em ausência de glicerol foram registrados para o sistema B, em comparação aos demais sistemas. Sugere-se que este comportamento possa ser explicado, em parte, pela estrutura do EDC, solúvel em água e com um íon monovalente considerado grande como o íon cloro ( $\text{Cl}^-$ ). A presença de suas cargas difusas na superfície e, portanto, um fraco campo elétrico, pode fazer com que as moléculas de água sejam polarizadas somente na primeira camada de hidratação. Consequentemente, a viscosidade cai para valores inferiores.

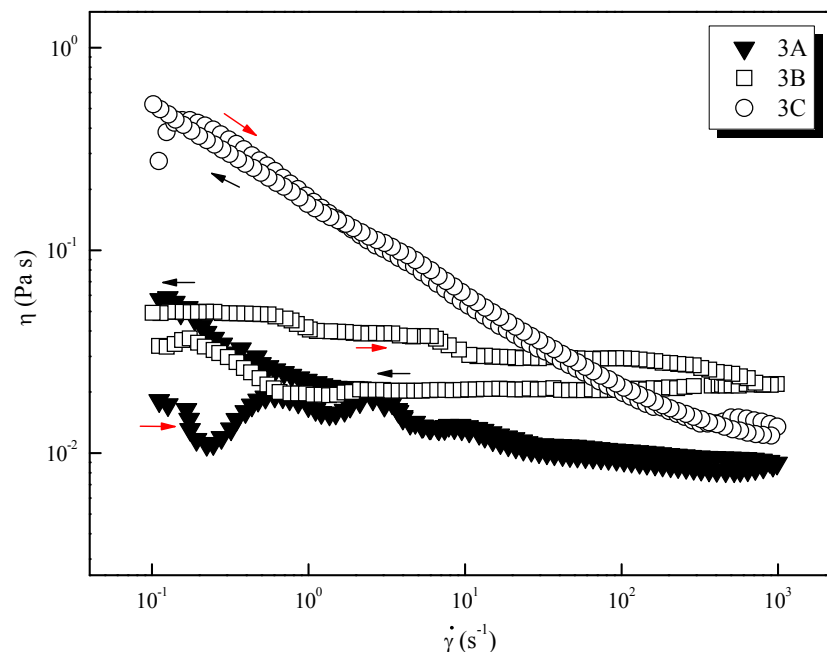


Figura 5.3 – Curvas de viscosidade em função da taxa de cisalhamento para suspensões de gliadina e glicerol (10 % m/m de gliadina). Sistema 3A: não reticulado; Sistema 3B: gliadina/glicerol/[EDC/NHS] (3,0 % m/m de gliadina); Sistema 3C: gliadina/glicerol/L-cisteína (1,5 % m/m de gliadina). As setas vermelhas e pretas indicam o sentido do início e final da análise, respectivamente.

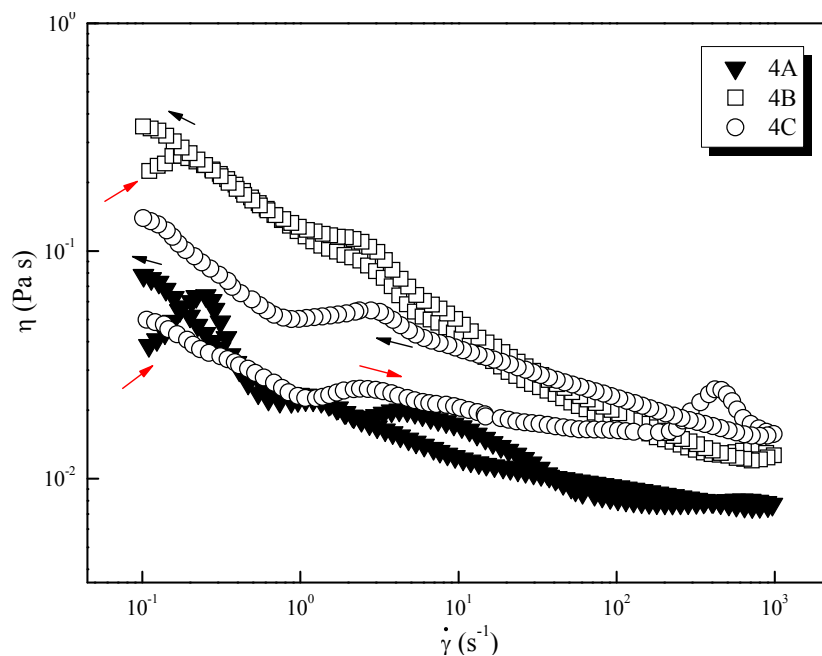


Figura 5.4 - Curvas de viscosidade em função da taxa de cisalhamento para suspensões de gliadina e glicerol (15 % m/m de gliadina). Sistema 4A: não reticulado; Sistema 4B: gliadina/glicerol/[EDC/NHS] (3,0 % m/m de gliadina); Sistema 4C: gliadina/glicerol/L-cisteína (1,5 % m/m de gliadina). As setas vermelhas e pretas indicam o sentido do início e final da análise, respectivamente.

Curiosamente, as variações na viscosidade ao longo da taxa de cisalhamento, permitiram que um mesmo sistema apresentasse diferentes padrões de comportamento na presença e ausência de glicerol e ainda, de acordo com a concentração de plastificante empregada. Este é o caso do sistema A; o qual é pseudoplástico na ausência de glicerol, mas sofre histerese na presença de 5 % de plastificante e tem sua viscosidade diminuída à medida que a concentração de glicerol aumenta na suspensão.

Estas oscilações na sua viscosidade estão mais evidentes nas taxas de cisalhamento situadas entre  $10^{-1}$  a  $10^1 \text{ s}^{-1}$ . Dentro desta faixa, possivelmente as modificações estruturais (orientação com o fluxo) podem estar ocorrendo em menor grau, ocasionando, por consequência, queda nos valores de viscosidade devido ao aumento constante na taxa de cisalhamento (possibilitando às cadeias que se desaglomerem). Quanto ao fato da viscosidade diminuir com o aumento da concentração de glicerol nas taxas de cisalhamento empregadas, pode estar indicando que a formação de aglomerados de partículas em suspensão é desfavorecida pela presença do mesmo nos sistemas de proteína não reticulada.

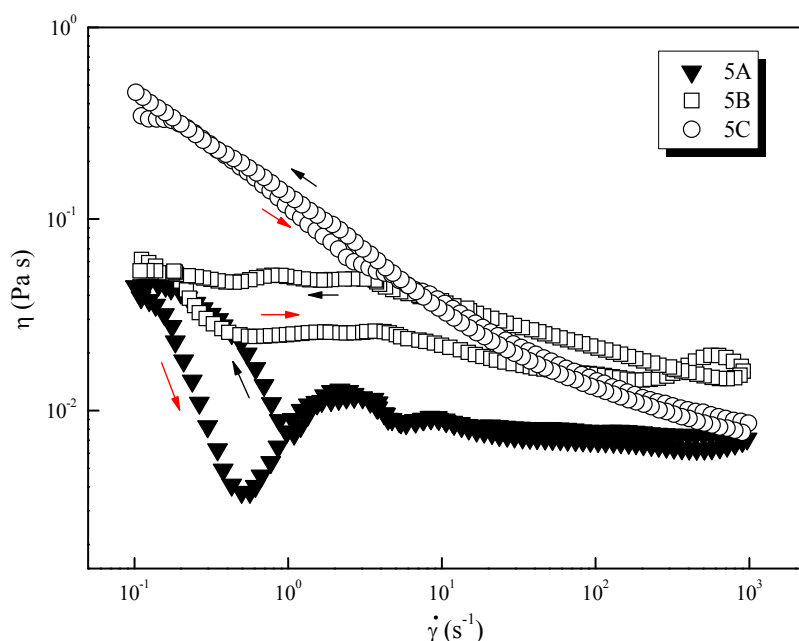


Figura 5.5 - Curvas de viscosidade em função da taxa de cisalhamento para suspensões de gliadina na presença de 20 % de glicerol (m/m de gliadina). Sistema 5A: suspensão de gliadina ( $100 \text{ mg mL}^{-1}$ )/glicerol; Sistema 5B: gliadina/glicerol/[EDC/NHS] (3,0 % m/m de gliadina); Sistema 5C: gliadina/glicerol/L-cisteína (1,5 % m/m de gliadina). As setas vermelhas e pretas indicam o sentido do início e final da análise, respectivamente.

O sistema B apresentou para uma mesma concentração de plastificante, valores de viscosidade final maiores que os valores de viscosidade inicial. Tratando-se de um sistema

que contém além do plastificante a adição de [EDC/NHS]; o processo de reticulação pode ser assegurado por medidas de aumento de viscosidade, o que de fato ocorreu. No entanto, a viscosidade final mais elevada nem sempre foi proporcional a concentração de glicerol na suspensão, evidenciando que a quantidade de plastificante, embora tenha facilitado o processo de reticulação (Capítulo 4), não contribuiu por si só no aumento da viscosidade e consequentemente, no grau de reticulação.

Com o intuito de investigar este comportamento e a influência da concentração de [EDC/NHS] na reticulação, bem como o papel do glicerol no favorecimento deste processo; análises quantitativas foram empregadas e o resultado deste monitoramento pode ser visualizado nas Figuras 5.6 a 5.8. A Figura 5.6 mostra os moles de grupos  $\epsilon$ -amino em função do conteúdo de glicerol em um sistema contendo somente gliadina e um segundo contendo [EDC/NHS] (3,0 % m/m de gliadina).

Neste tipo de análise uma determinação acurada irá depender fundamentalmente dos grupos não reticulados que participam da reação com TNBS.<sup>89</sup> Conforme o esperado, é possível notar que a suspensão de gliadina na ausência de [EDC/NHS], apresentou maior conteúdo de grupos  $\epsilon$ -amino em comparação à suspensão de gliadina reticulada. Além disso, as duas suspensões apresentaram similaridades no padrão de grupos  $\epsilon$ -amino disponíveis a diferentes concentrações de glicerol, revelando que mesmo a uma mesma quantidade de [EDC/NHS], o papel do glicerol parece estar relacionado com a disposição dos grupos carboxílicos para a reação de reticulação. Como exemplo deste comportamento, na Figura 5.6 a 15 % de plastificante, os dois sistemas revelam um decréscimo significativo nos grupos  $\epsilon$ -amino. Uma possível hipótese para este comportamento seria a de que nesta concentração, ocorre uma significativa redução nas forças intermoleculares e, como consequência, o aumento na mobilidade das cadeias poliméricas tornaria possível a perda de alguns resíduos de lisina (contendo grupos amino) durante o passo de extração na metodologia por TNBS. Outra hipótese se daria caso ocorresse a reação entre o próprio TNBS e os grupos sulfidril disponíveis na molécula de gliadina; na ocorrência desta possibilidade, haveria uma contribuição significativa para a perda de grupos amino durante o processo de extração. Indo mais além, não se poderia descartar o fato destes dois processos estarem ocorrendo simultaneamente.

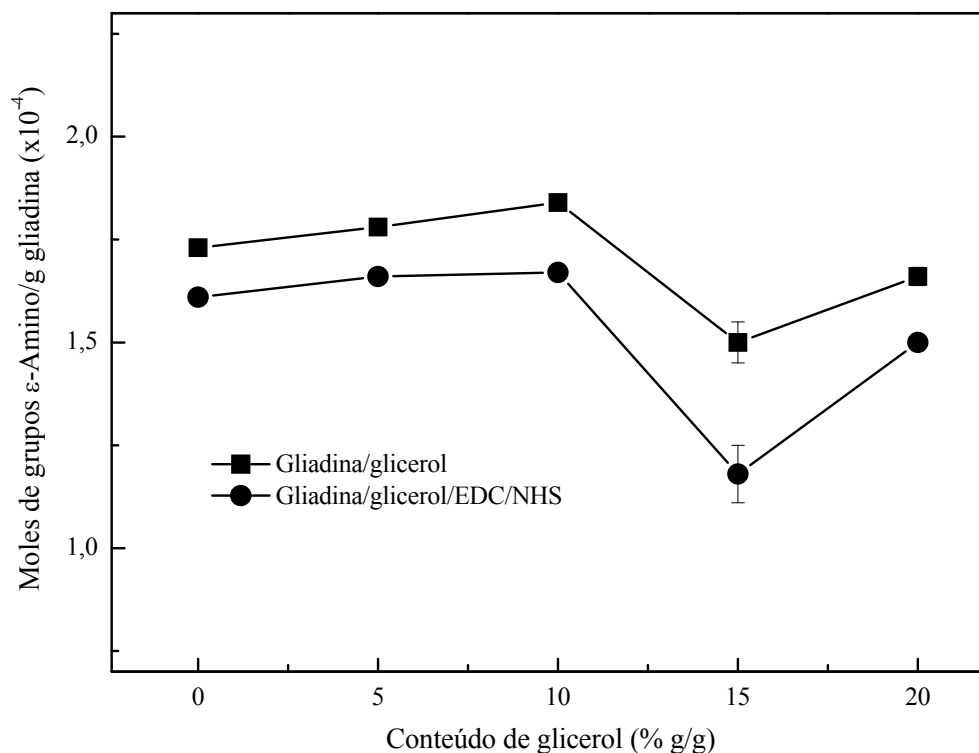


Figura 5.6 - Moles de grupos  $\epsilon$ -Amino/g de gliadina ( $\times 10^{-4}$ ) em função do conteúdo de glicerol (% m/m de gliadina).

No entanto, estas hipóteses tornam-se enfraquecidas pela simples observação das curvas de fluxo (Figura 5.4) nesta faixa de concentração de glicerol (15 %). O sistema B nesta figura revela uma mudança abrupta no padrão de comportamento, elevando sua viscosidade, sobrepondo-se e ultrapassando inclusive o sistema C, até então o mais viscoso.

É indiscutível o fato de o cisalhamento poder favorecer inclusive o processo de reticulação, pois neste momento, rearranjos estruturais tornam possível a exposição de grupos carboxílicos sujeitos ao processo de reticulação. No entanto, esta coincidência de comportamentos na análise quantitativa e na reologia, mostra que com 15 % de glicerol, a eficiência de reticulação pode estar atingindo o seu máximo, revelando que nesta concentração, o plastificante pode estar favorecendo a dispersão dos grupos amino presentes nas cadeias laterais. Esta disponibilidade para reticulação pode inclusive acarretar o aumento da viscosidade, processo que pôde ser observado na Figura 5.4.

O efeito do conteúdo de [EDC/NHS] à suspensão pode ser visualizado nas Figuras 5.7 e 5.8.

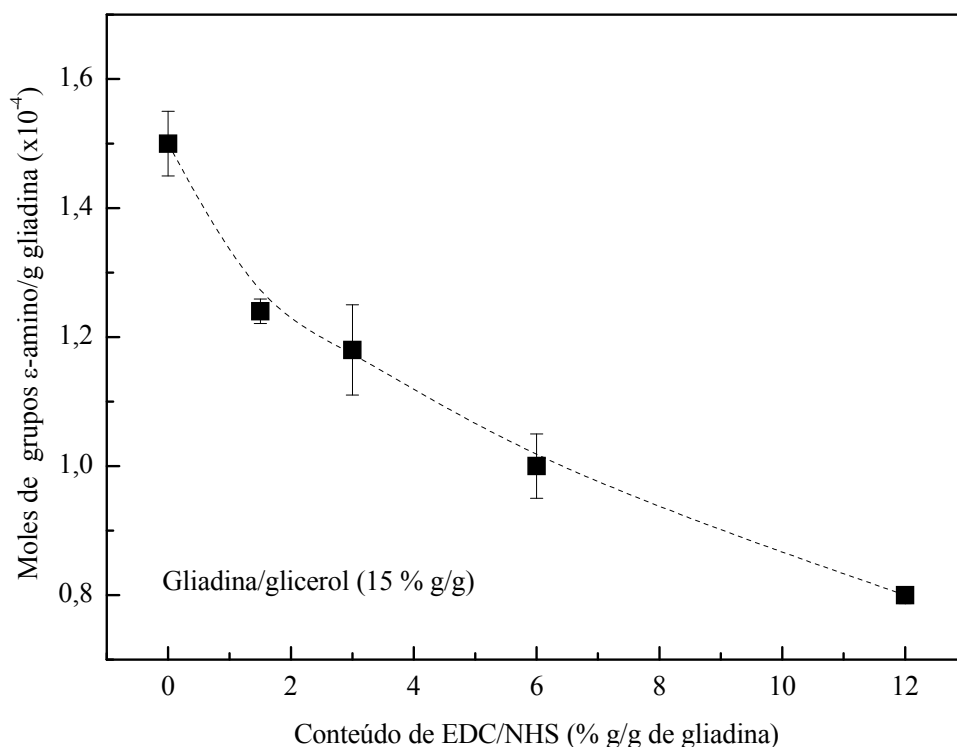


Figura 5.7 – Moles de grupos ε-Amino/g de gliadina ( $\times 10^{-4}$ ) em função do conteúdo de [EDC/NHS] (% m/m de gliadina).

O aumento de sua concentração na mistura revela a redução na quantidade de grupos amino livres, refletindo o processo de reticulação. Ademais, a 12 % de reticulante, o grau de reticulação (% R) atinge quase 50 % e a tendência da curva mostra que possivelmente porcentagens maiores seriam alcançadas manipulando-se concentrações maiores de [EDC/NHS]. No entanto, no presente trabalho, ao ser iniciado o estudo dos filmes formados a partir de suas suspensões a concentrações entre 6 e 12 % de [EDC/NHS] (Capítulo 6), houve o comprometimento na reprodutibilidade dos ensaios e o manuseio dos filmes tornou-se dificultado mesmo trabalhando-se a umidades relativas baixas (9 e 23 %).

Outro fator relevante quanto ao grau de reticulação alcançado nas análises empregadas deve-se ao fato de que o mecanismo de reação do [EDC/NHS] com ácido carboxílico em meio aquoso parece ser mais complicada do que aquelas ocorridas em solvente orgânico.<sup>77</sup> No presente trabalho, o solvente empregado trata-se de uma mistura água/etanol (60/40 v/v), no entanto, torna-se dificultoso saber exatamente quanto de cada solvente pode ter contribuído mais ou menos para que o processo de reticulação fosse efetuado.

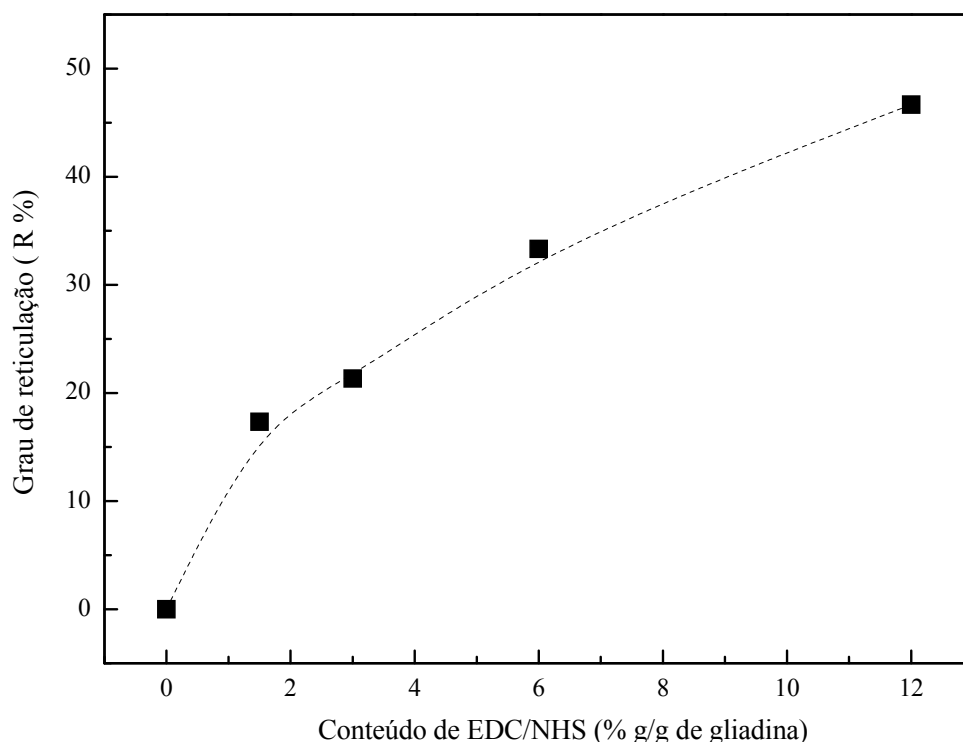


Figura 5.8 – Grau de reticulação (R %) em função do conteúdo de [EDC/NHS] (% m/m de gliadina) na suspensão de gliadina/glicerol/[EDC/NHS].

As suspensões de gliadina reticuladas com L-cisteína (Figuras 5.1 a 5.5) apresentaram os maiores valores de viscosidade final, no entanto, oscilações em seus valores ocorreram mediante a presença de glicerol. O fato de a viscosidade final ter sido maior quando comparada aos outros dois sistemas, sugere que o processo de reticulação pode estar acontecendo mais rapidamente do que o tempo necessário para que o sistema B reticule. Na Figura 5.1, por exemplo, o sistema C, na ausência de glicerol mostra maior viscosidade em comparação aos demais sistemas, frente a toda a taxa de cisalhamento empregada. Esta viscosidade aumentada pode ser explicada pela presença dos resíduos de *L*-cisteína os quais estão envolvidos em ligações dissulfeto inter e intramoleculares.<sup>59,78,90</sup>

Neste contexto, a gliadina adicionada de *L*-cisteína apresentou indícios de extensiva reticulação via formação de ligações dissulfeto intermoleculares, o que resultaria na formação de agregados maiores e, portanto, no aumento de sua massa molar e viscosidade, quando comparada a gliadina nativa. Estas observações foram investigadas através de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS PAGE) (Figura 5.9). A linha 1 apresenta a gliadina não reticulada ou nativa enquanto as linhas 2, 3 e 4 mostram a gliadina após adição de 0,5; 1,5 e 3,0 % de L-cisteína (m/m de gliadina), respectivamente. As linhas 5, 6 e 7 apresentam as suspensões de



gliadina com diferentes concentrações de *L*-cisteína, seguindo a mesma ordem de concentração das linhas 2, 3 e 4, no entanto, na presença de agente redutor ( $\beta$ -mercaptoetanol). Nas linhas em ausência de agente redutor e com adição de *L*-cisteína, é possível observar a formação de agregados de massa molar elevada indicando possivelmente o processo de ligações cruzadas via trocas SH/SS, uma vez que estes agregados não estão presentes na linha 1.

A confirmação da formação destes agregados via ligações dissulfeto pôde ser realizada observando-se as linhas subseqüentes. O desaparecimento dos agregados de massa molar elevada na presença do agente redutor, o qual é capaz de clivar as ligações dissulfeto, indica que a *L*-cisteína foi capaz de promover o processo de reticulação. O desaparecimento destes agregados, no entanto, corrobora com as reações de troca via reações de troca (dissulfeto/sulfidrina) resultante dos rearranjos e interações intra e intermoleculares na gliadina. Os resultados encontrados a partir desta análise estão de acordo com o encontrado por Muñoz *et al.*<sup>59</sup> ao avaliar as propriedades funcionais de filmes de gliadina obtidos mediante adição de *L*-cisteína na concentração de 2,0 % (m/m de gliadina).

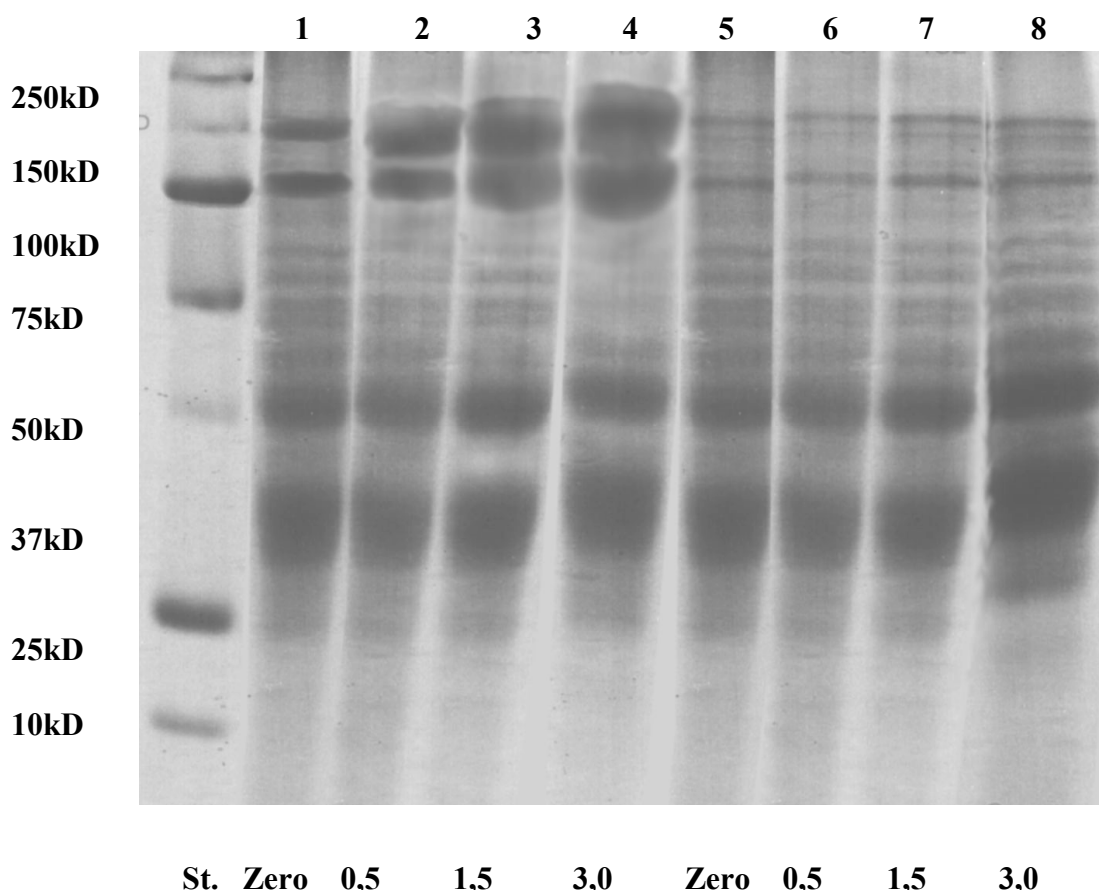


Figura 5.9 – Eletroforegrama mostrando SDS-PAGE (12 %) na ausência (linhas 1, 2, 3, 4) e presença de agente redutor (linhas 5, 6, 7, 8) e com a adição de diferentes concentrações de L-cisteína (0,5; 1,5 e 3,0 % m/m de gliadina). St = padrão molecular.

Entretanto, com base nas curvas de viscosidade é possível observar que à medida que a quantidade de glicerol foi sendo aumentada nas suspensões, houve variações em seus valores, no entanto, os valores de viscosidade das suspensões foram sempre inferiores ao valor observado na ausência de plastificante. Além disso, a 15 % de plastificante, além de ter sua viscosidade bastante diminuída em comparação a gliadina reticulada na ausência de glicerol, o padrão da curva também parece ter sofrido modificações, mostrando inclusive uma zona de histerese até então ausente no sistema C.

Com base neste comportamento e levando-se em consideração as mudanças ocasionadas pela adição de glicerol, dois aspectos relevantes podem estar ocorrendo na suspensão:

i) O primeiro deles diz respeito ao aumento do volume livre ocasionado pela presença do plastificante, neste caso, haveria a redução das interações inter e intramoleculares. Como o processo de reticulação depende dos dois tipos de interações, ou seja, os rearranjos antes

possíveis estarão em certo grau impedidos, o que não contribuirá significativamente para o processo de reticulação e resultará também na queda da viscosidade. Deduz-se a partir daí que os grupos sulfidríla presentes nos segmentos intracadeia e disponíveis para a clivagem pela L-cisteína, precisam estar disponíveis para os possíveis rearranjos e formação de aglomerados que resultem em aumento de viscosidade.

ii) Uma segunda consideração leva em conta que a queda de viscosidade na presença de glicerol pode estar sendo facilitada pelo cisalhamento durante a análise. Neste caso, o cisalhamento estaria interferindo na estabilidade da estrutura da proteína mantida através de ligações dissulfeto, forças iônicas e polares, e estaria promovendo o desenovelamento de sua estrutura tridimensional. Esta desestabilização resultaria no processo de desaglomeração das partículas e, conseqüentemente, ocasionaria a queda da viscosidade.

Dentre os principais fatores que governam o comportamento de suspensões não newtonianas estão a massa molar, a distribuição de massa molar, topologia molecular (presença de ramificações) e concentração da suspensão. Levando-se em consideração que os sistemas A, B e C apresentaram um padrão similar nas curvas de viscosidade, as sutis diferenças pré-existent e ditas como fatores que governam o comportamento das suspensões, podem ter sido intensificadas pela presença do plastificante, o qual intensificou não somente mudanças entre os sistemas, como também diferenças dentro de uma mesma suspensão, seja esta reticulada ou não.

Como houvera sido citado anteriormente, as diferenças nas curvas de viscosidade entre os sistemas modificados quimicamente também podem ter sido ocasionadas pelas individualidades de cada suspensão quanto ao tempo necessário para que o processo de reticulação seja efetuado. Em outras palavras, o período decorrido nos experimentos realizados no domínio linear pode não ter sido satisfatório para que os sistemas tenham efetuado o máximo de rearranjos e associações possíveis, capazes de influenciar na viscosidade das suspensões.

De forma a entender melhor a dependência do tempo no comportamento cinético destas reações, experimentos oscilatórios foram empregados a diferentes concentrações de [EDC/NHS] e L-cisteína; na ausência e presença de glicerol. Para efeito de comparação, medidas para obtenção de parâmetros oscilatórios em suspensões de gliadina ( $100 \text{ mg mL}^{-1}$ ) não reticuladas também foram realizados. O resultado destes experimentos pode ser visualizado nas Figuras 5.10 a 5.23.

As Figuras 5.10 e 5.11 mostram a dependência dos módulos elástico ( $G'$ ) e de perda ( $G''$ ) e de  $\tan \delta$  ( $G''/G'$ ) em função do tempo e à frequência constante para os sistemas de gliadina não reticulados, na ausência e presença de plastificante, respectivamente.

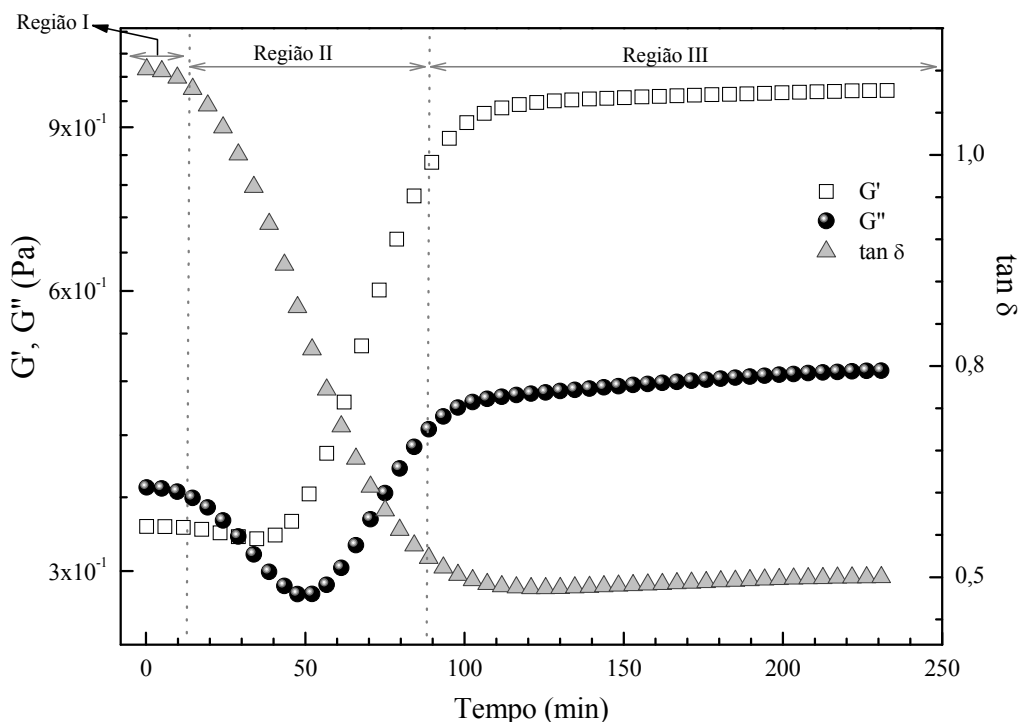


Figura 5.10 - Dependência de  $G'$ ,  $G''$  e  $\tan \delta$  em função do tempo para a suspensão de gliadina ( $100 \text{ mg mL}^{-1}$ ) não reticulada e na ausência de plastificante.

Na ausência de plastificante,  $G'$  e  $G''$  apresentaram perfis de curvas semelhantes as quais atingiram um platô no tempo,  $t = 88 \text{ min}$ . Em paralelo, o valor de  $\tan \delta$  decrescera atingindo também um platô e o valor mínimo de 0,48. Entretanto, como pode ser observado na Figura 5.10, as curvas representadas por  $G'$  e  $G''$  cruzaram-se no tempo,  $t = 28 \text{ min}$ , semelhante ao tempo observado para metilcelulose (MC) e hidroxipropilmetilcelulose (HPMC)<sup>91</sup>. Neste momento, há uma indicação de que o sistema não reticulado e na ausência de glicerol apresenta um ponto de transição sol-gel ( $G' = G''$ ); durante o qual o sistema muda o seu comportamento que até então era o de um líquido viscoso ( $G'' > G'$ ), passando a se comportar como um sistema predominantemente elástico ( $G' > G''$ ).

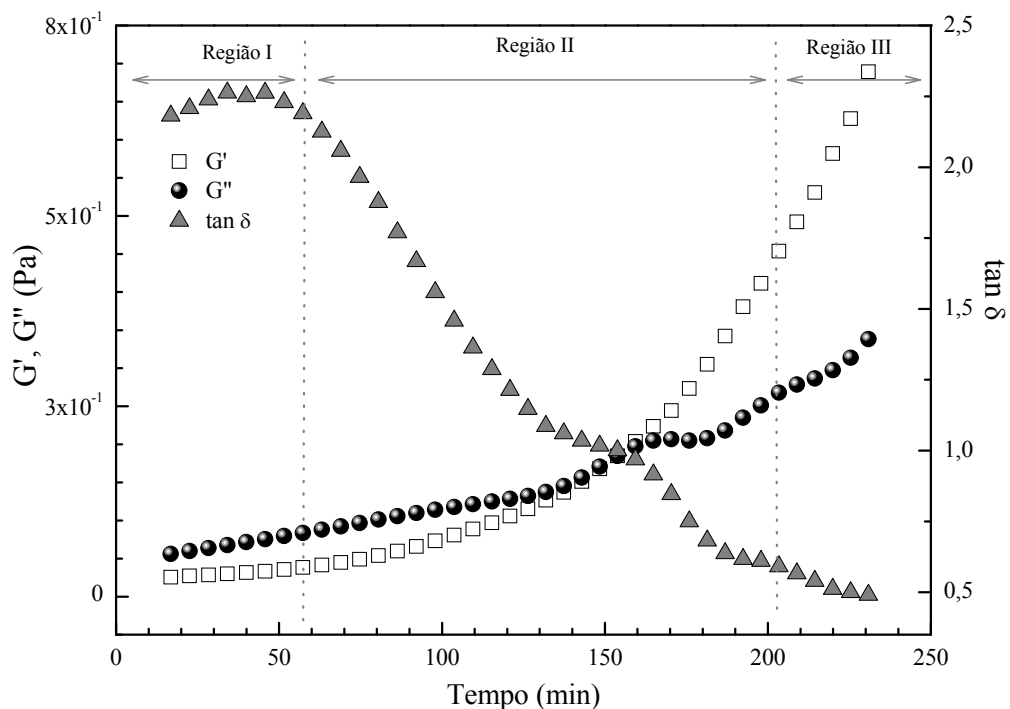


Figura 5.11 - Dependência de  $G'$ ,  $G''$  e  $\tan \delta$  em função do tempo para a suspensão de gliadina ( $100 \text{ mg mL}^{-1}$ ) não reticulada e com adição de glicerol como plastificante (15 % m/m de gliadina).

O perfil das curvas parece ter mudado significativamente com a adição de glicerol ao sistema (Figura 5.11), o qual parece ter provocado o aumento da distância entre as cadeias na proteína. Ao contrário do sistema não plastificado, a evolução das curvas  $G'$  e  $G''$  deu-se de maneira distinta. No entanto, ainda assim, foi observado um ponto de transição sol-gel no tempo,  $t = 154 \text{ min}$ , mostrando que adição do plastificante ao sistema não reticulado parece ter induzido um retardo em sua transição sol-gel, o que significa que a maior parte do tempo decorrido para o experimento, o sistema com glicerol comportou-se como um líquido viscoso ( $G'' > G'$ ). A existência de um ponto de transição sol-gel tanto na ausência quanto na presença de glicerol, mostra que o mesmo não impede que ocorra a agregação das moléculas com certo grau de ordem, o que resultará na formação de uma rede tridimensional organizada nos dois sistemas.

Embora tenham ocorrido de formas diferenciadas, foram identificadas três regiões principais nos dois sistemas estudados. Estas regiões ou domínios foram nomeados como sendo I, II e III e estão indicadas nas Figuras 5.10 e 5.11, respectivamente. A região I pode ser caracterizada como um período de indução no qual  $G'$  e  $G''$  não mudam significativamente com o tempo; durante este período, o sistema acrescido de glicerol apresentou uma área

significativamente maior, significando que o tempo necessário para o aumento de  $G'$  e  $G''$  foi superior ao sistema não plastificado. Desta forma, a formação de uma rede tridimensional organizada parece estar mais impedida, ou ainda, sua formação pode estar sendo delongada de alguma forma pela adição de glicerol ao sistema.

Uma rede tridimensional de proteína, bem como a sua estrutura terciária é formada via ligações não covalentes (interações hidrofóbicas), ligações de hidrogênio ou interações eletrostáticas, e menos frequentemente, como é o caso da gliadina, por interações covalentes como as pontes dissulfeto. A contribuição de cada um destes tipos de ligação vai depender das propriedades de cada proteína e o meio em que ela se encontra.<sup>92,93</sup>

Portanto, ao adicionar glicerol, além de estar reduzindo as interações proteína-proteína, sua estrutura polar pode também estar contribuindo para instabilidade da proteína. Neste ínterim, supõe-se que as interações entre os grupos polares inter e intracadeias presentes na estrutura terciária da gliadina estarão sendo desestabilizadas, o que requereria mais tempo para a promoção de rearranjos necessários que contribuíssem para a transição sol-gel.

Na região II, a estrutura da rede inicia-se e o módulo elástico ( $G'$ ) aumenta paulatinamente com o tempo. Nesta região, também se pode observar diferenças no tempo requerido para a transição sol-gel. No entanto, ambos os sistemas apresentam o contínuo aumento de  $G'$  e  $G''$  após suas respectivas transições, e seguem com esta evolução por toda a região III, onde constata-se diferenças entre os sistemas quanto a estabilidade do gel formado e aos valores de  $G'$  e  $G''$  para os dois sistemas estudados. Enquanto que na Figura 5.10 podemos observar uma região linear e praticamente estável que perdura até o final do experimento ocupando uma área maior dentre as regiões, a Figura 5.11 mostra além de uma área reduzida o concomitante aumento de  $G'$  e  $G''$  ainda sem atingir o ponto conhecido como saturação de  $G'$ . Mediante este comportamento, constata-se a necessidade de um tempo maior para a estabilização do gel formado no sistema acrescido de glicerol e supõe-se ainda, um aumento continuado de  $G'$  e  $G''$  até valores similares aos observados para o sistema sem plastificante.

O primeiro dos sistemas reticulados quimicamente a ser analisado trata-se do sistema composto por gliadina/[EDC/NHS] na ausência de glicerol. Nas Figuras 5.12, 5.13 e 5.14 podem ser observados  $G'$ ,  $G''$  e  $\tan \delta$  em função do tempo e a diferentes concentrações de [EDC/NHS], respectivamente.

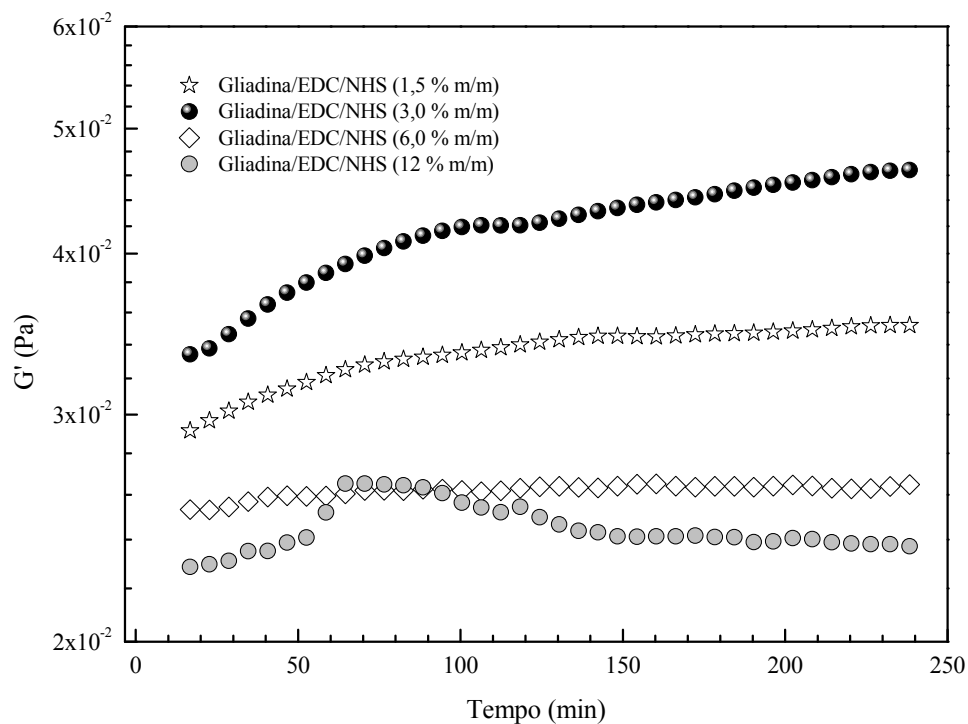


Figura 5.12 - Dependência de  $G'$  em função do tempo para as suspensões de gliadina ( $100 \text{ mg mL}^{-1}$ ) reticuladas com diferentes concentrações de [EDC/NHS] e na ausência de plastificante. A concentração de reticulante aparece indicada na figura.

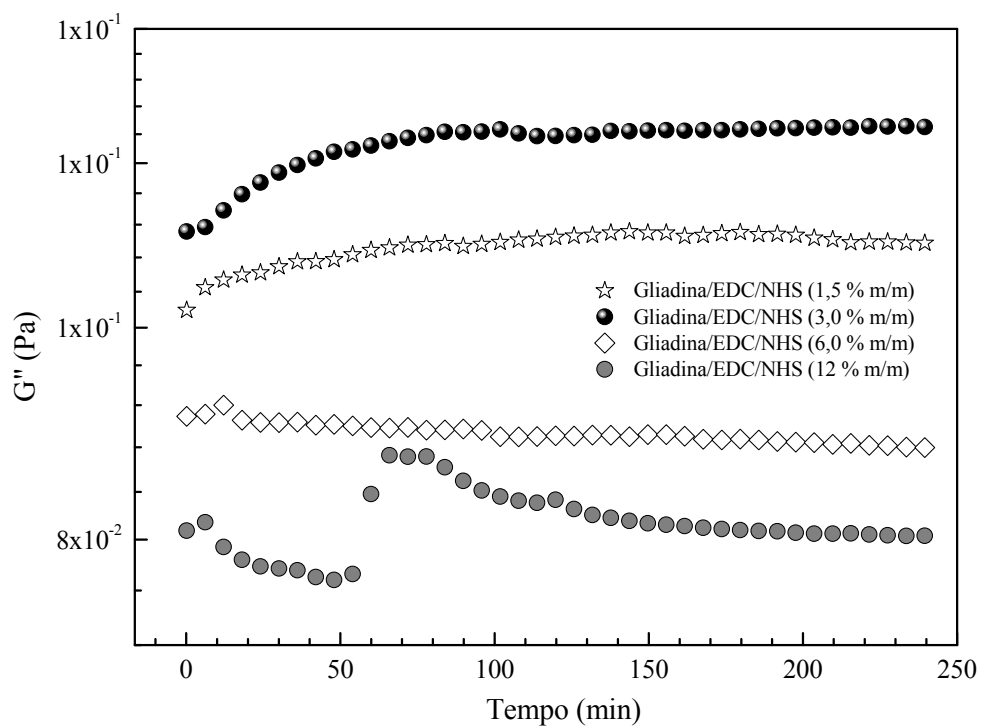


Figura 5.13 - Dependência de  $G''$  em função do tempo para as suspensões de gliadina ( $100 \text{ mg mL}^{-1}$ ) reticuladas com diferentes concentrações de [EDC/NHS] e na ausência de plastificante. A concentração de reticulante aparece indicada na figura.

As dependências dos valores de  $G'$  e  $G''$  em função do tempo na ausência de plastificante (Figura 5.12 e 5.13) mostram que o sistema gliadina/[EDC/NHS] na concentração 3,0 % de reticulante (m/m de gliadina), apresentou os maiores valores de módulo ( $G'$  e  $G''$ ), seguidos pelas concentrações 1,5; 6,0 % e 12 %. Para toda a faixa de concentração de reticulante empregada foi observado o brando aumento de  $G'$  em função do tempo, enquanto que as mudanças para  $G''$  seguiram o mesmo comportamento em ordem de grandeza maior.

Quanto aos valores de  $\tan \delta$  ( $G''/G'$ ) as maiores diferenças detectadas entre os valores finais e iniciais foram observadas para o sistema com 3 % de [EDC/NHS] (4,5 – 2,81) (Figura 5.14). Ao contrário das suspensões não reticuladas discutidas anteriormente, não houve o surgimento de qualquer transição sol-gel para todas as faixas de concentração de [EDC/NHS] estudadas, além disso, um comportamento predominantemente viscoso ( $G'' > G'$ ) prevaleceu durante todo o tempo.

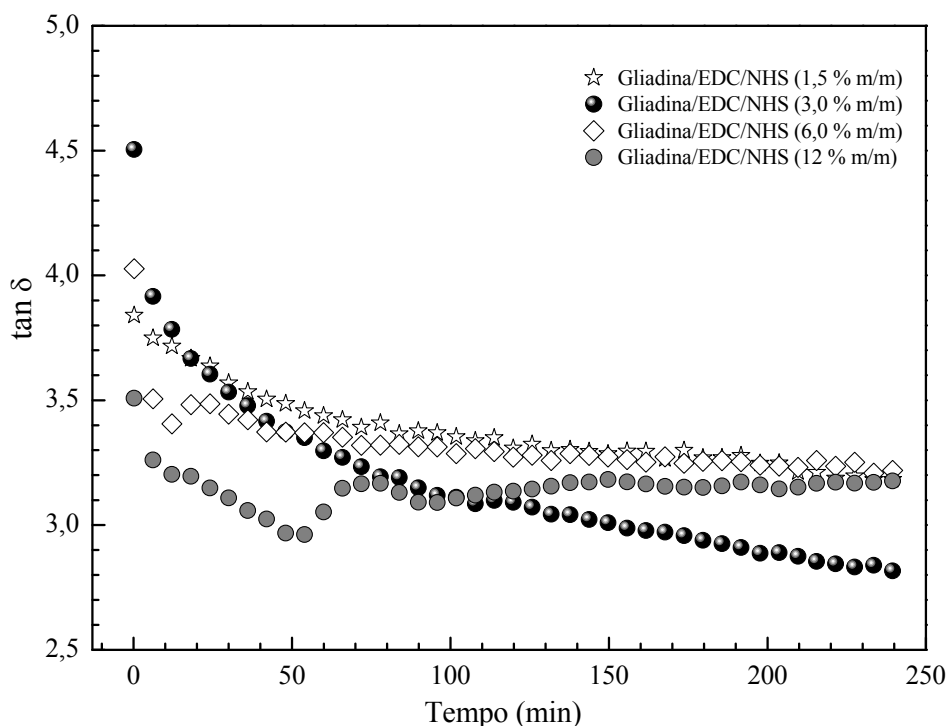


Figura 5.14 - Dependência de  $\tan \delta$  em função do tempo para as suspensões de gliadina ( $100 \text{ mg mL}^{-1}$ ) reticuladas com diferentes concentrações de [EDC/NHS] e na ausência de plastificante. A concentração de reticulante aparece indicada na figura.



As condições para que a reação de reticulação por [EDC/NHS] ocorra, bem como o processo de reticulação por si só, podem ter desencadeado diferentes fenômenos que individualmente ou em conjunto contribuíram para o tipo de comportamento encontrado, são estes:

I - Inicialmente, a redução do pH (4 – 5) e o aquecimento constante (55 °C) podem ter provocado não somente a desnaturação, mas também o desenovelamento da proteína com concomitante redução das interações eletrostáticas, redução da agregação e perda da estrutura globular, este último, somente na ausência de plastificante (análise de Kratky, capítulo 4);

II - A adição de EDC com NHS é realizada no intuito de estabilizar os grupos intermediários reativos, esta etapa da reação pode ocorrer muito lentamente. Além disso, a reticulação pode ser induzida também durante o processo de evaporação dos filmes de gliadina formados posteriormente (capítulo 6), uma vez que a atividade do EDC pode durar mais de 150 minutos, tempo no qual as suspensões podem ser preparadas e os filmes expostos a secagem;

III - A quantidade de NHS pode não ter sido suficiente para estabilizar os grupos carboxílicos presentes na proteína. Neste caso, a reação de reticulação pode ter gerado alguns compostos intermediários como os compostos *o-acilisourea* e, posteriormente, derivados de uréia que teriam sido formados mediante a reação entre os grupos carboxílicos ionizados e o EDC. Todos estes derivados podem ser rapidamente hidrolisados e permanecer na suspensão, os mesmos só seriam removidos pela lavagem com água, ácidos diluídos ou na evaporação da suspensão e formação do filme. Neste contexto, estariam contribuindo para desestabilizar interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio na estrutura da gliadina.

IV - A mudança da força iônica da suspensão ocorrida pela mudança de pH e adição de [EDC/NHS] ao sistema pode ter ocasionado uma redução na mobilidade dos íons, bem como uma redução na dissociação dos grupos carboxílicos necessários para a reticulação;

V - A prolina, aminoácido que possui seu ângulo torsional diferenciado e está presente em quantidade razoável na gliadina, pode ter ocasionado o rompimento da estrutura helicoidal. Uma vez ocorrido este processo, estruturas com cadeias aleatórias podem ocorrer, influenciando consequentemente nos valores de  $G'$  e  $G''$ .

Com base nestas cinco possibilidades, sejam estas individualmente ou em conjunto, pode-se inferir que os mesmos pode(m) ter sido responsável (eis) pelo comportamento mais viscoso do que elástico ( $G'' > G'$ ) no sistema composto por gliadina/[EDC/NHS]. Não obstante, os estudos realizados no capítulo 4 e os resultados obtidos através de estudos reológicos sugerem que a reticulação por [EDC/NHS] pode estar levando inicialmente à formação de pequenos agregados localizados entre os espaços situados entre as cadeias distribuídas randomicamente.

Quanto ao perfil das curvas nos experimentos oscilatórios, o mesmo parece não ter sido grandemente alterado pela adição de glicerol ao sistema (Figuras 5.15 e 5.16), e os valores de  $G'$  entre o sistema plastificado e não plastificado foram bastante similares, com exceção do sistema gliadina/[EDC/NHS] na concentração de 3,0 % (m/m de gliadina), onde foram observadas diferenças em  $G'$  e  $G''$  entre os sistemas com e sem adição de glicerol.

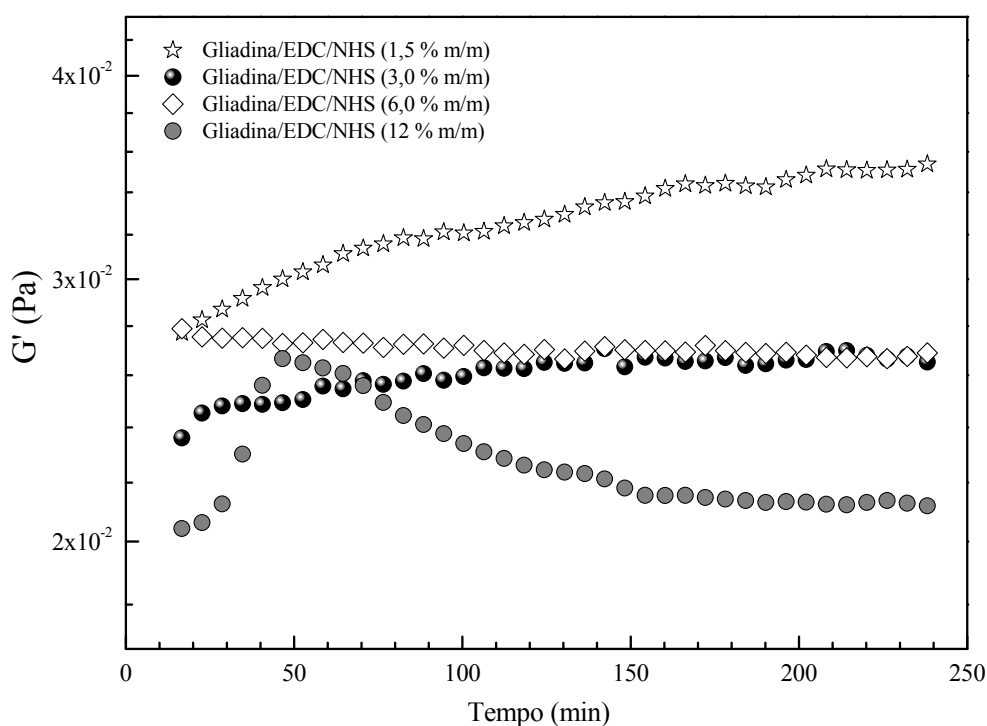


Figura 5.15 - Dependência de  $G'$  em função do tempo para suspensões de gliadina (100 mg mL<sup>-1</sup>) reticuladas com diferentes concentrações [EDC/NHS] e com adição de plastificante (15 % m/m). A concentração de reticulante aparece indicada na figura.

Curiosamente, um pico sobressalente surgiu nos sistemas gliadina/[EDC/NHS] (12 % m/m de gliadina) tanto na ausência quanto na presença de glicerol. Este pico surgiu a tempos

semelhantes de análise (entre  $t = 50$  e  $t = 100$  min) e pode ter sido resultante do excesso de [EDC/NHS] adicionado ao sistema, o que ocasionaria a formação de derivados bastante estáveis como *N*-acilisouréia, os quais induziriam o aumento temporário de  $G'$  e  $G''$ . Também nesta concentração de reticulante e somente na presença de plastificante foi observado o aumento de  $\tan \delta$ , o qual pode estar indicando uma agregação linear de partículas primárias.

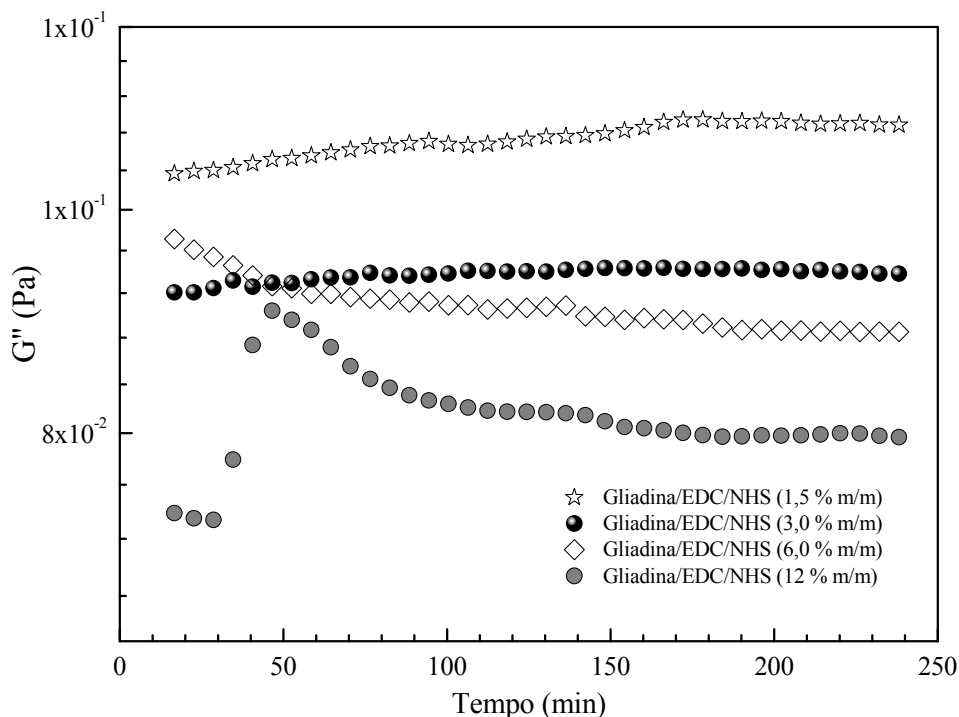


Figura 5.16 - Dependência de  $G''$  em função do tempo para suspensões de gliadina ( $100 \text{ mg mL}^{-1}$ ) reticuladas com diferentes concentrações [EDC/NHS] e com adição de plastificante (15 % m/m). A concentração de reticulante aparece indicada na figura.

O comportamento das suspensões de gliadina reticuladas com diferentes concentrações de L-cisteína, na ausência e presença de glicerol, pode ser acompanhado pelas Figuras que vão de 5.18 a 5.23.

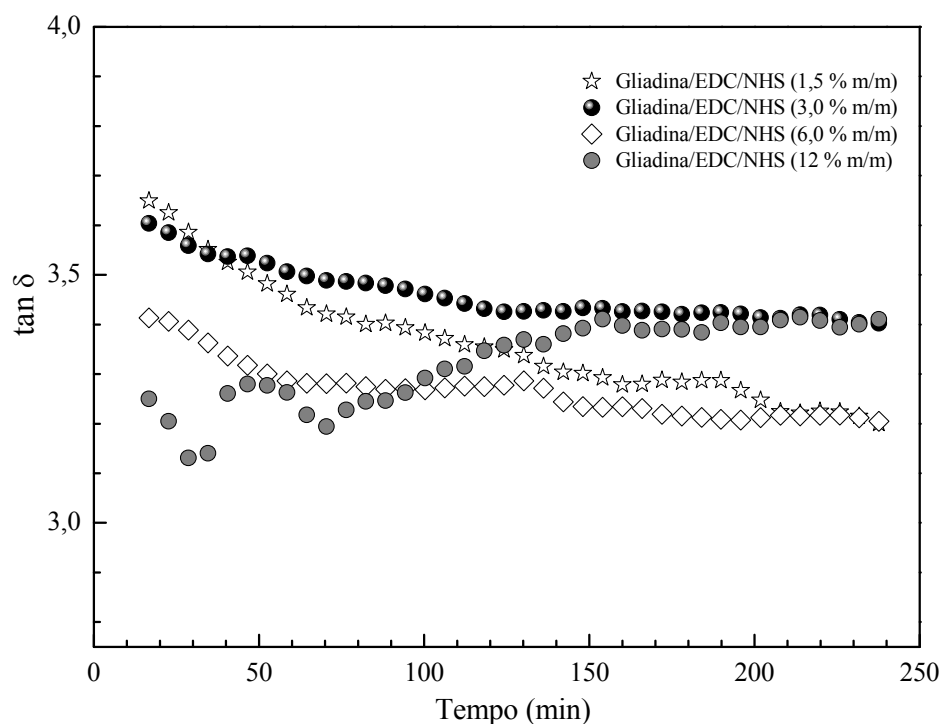


Figura 5.17 - Dependência de  $\tan \delta$  em função do tempo para suspensões de gliadina ( $100 \text{ mg mL}^{-1}$ ) reticuladas com diferentes concentrações [EDC/NHS] e com adição de plastificante ( $15 \% \text{ m/m}$ ). A concentração de reticulante aparece indicada na figura.

Iniciando-se a interpretação dos gráficos a partir das menores concentrações de L-cisteína adicionada às suspensões, na ausência e presença de plastificante, observam-se de maneira semelhante às Figuras 5.10 e 5.11 comentadas anteriormente, a presença de três regiões ou domínios que variaram suas áreas em função das concentrações de L-cisteína e também em função da presença ou ausência de glicerol.

Com base nas Figuras 5.10 e 5.18, é possível notar que a introdução de L-cisteína na concentração de  $0,5 \% \text{ (m/m de gliadina)}$  ao sistema não plastificado, parece ter estendido o tempo necessário para a transição sol-gel de  $t = 29 \text{ min}$  para  $t = 55 \text{ min}$ . Com a adição de glicerol aos sistemas (Figuras 5.11 e 5.19), a suspensão não reticulada, que anteriormente apresentava uma transição sol-gel em menos de  $40 \text{ min}$ , estende seu tempo até alcançar esta transição somente aos  $154 \text{ min}$ . No entanto, a adição de glicerol ao sistema reticulado parece ter reduzido em  $6 \text{ min}$  o tempo necessário para a transição sol-gel.

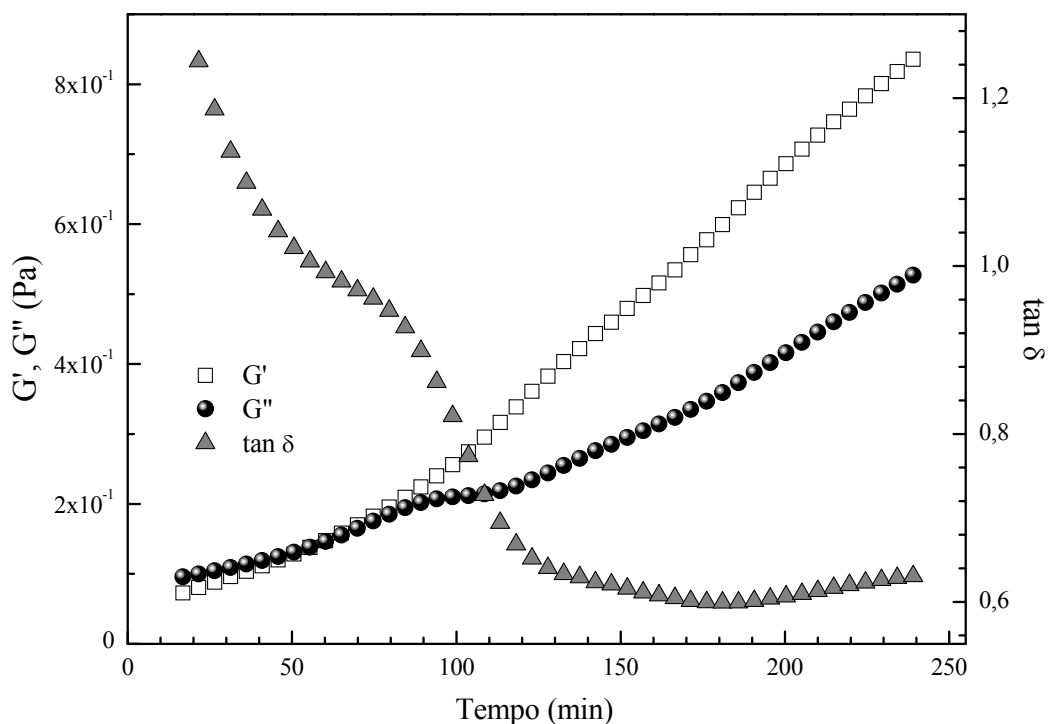


Figura 5.18 - Dependência de  $G'$ ,  $G''$  e  $\tan \delta$  em função do tempo para suspensões de gliadina ( $100 \text{ mg mL}^{-1}$ ) reticuladas com L-cisteína ( $0,5 \text{ \% m/m}$ ) e sem adição de plastificante.

Outra observação relevante ainda com relação às suspensões adicionadas de  $0,5 \text{ \%}$  de L-cisteína e com glicerol, está relacionada à mudança no perfil de suas curvas ( $G'$ ,  $G''$ ) que passaram de côncavas (na ausência de L-cisteína) a convexas. Entretanto, comparando-se as curvas nas suspensões nativas e as reticuladas, ambas em ausência de glicerol, respectivamente (Figuras 5.18 e 5.10), observa-se que as modificações estão principalmente relacionadas a estabilidade do sistema ou ponto de saturação de  $G'$ , que anteriormente iniciava-se em menos de  $100 \text{ min}$  e, na presença de L-cisteína, cresceu de maneira praticamente linear no decorrer da análise, não alcançando nenhum platô ou ponto de saturação de  $G'$ .

Todas as mudanças ocorridas no comportamento da suspensão de gliadina em presença de L-cisteína estão relacionadas principalmente à formação de ligações dissulfeto intermoleculares durante o processo de solubilização das proteínas em pH básico. A L-cisteína, conforme observado no eletroforegrama, pode reagir com grupamentos específicos na gliadina promovendo trocas entre os grupamentos S-H/S-S e consequentemente enfraquecendo ligações dissulfeto já existentes na estrutura da proteína.

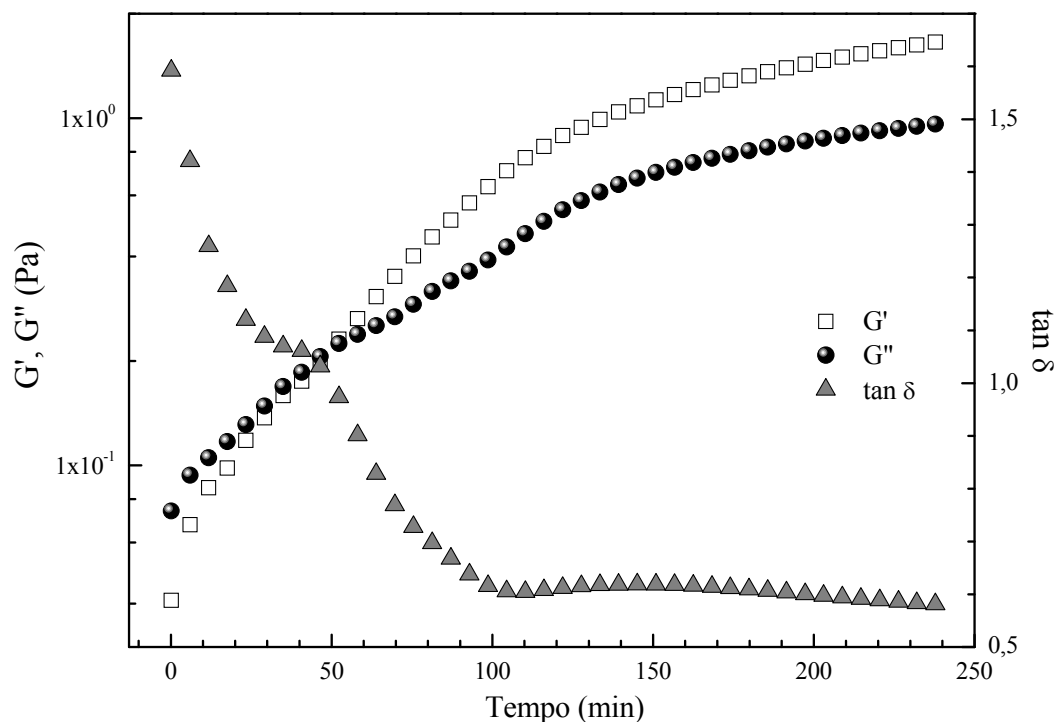


Figura 5.19 - Dependência de  $G'$ ,  $G''$  e  $\tan \delta$  em função do tempo para suspensões de gliadina ( $100 \text{ mg mL}^{-1}$ ) reticuladas com L-cisteína ( $0,5 \text{ \% m/m}$ ) e com adição de plastificante ( $15 \text{ \% m/m}$ ).

Apesar disso, a concentração de L-cisteína parece ser um critério fundamental para que as mudanças esperadas ocorram. Quantidades muito pequenas deste agente redutor podem clivar apenas algumas ligações intramoleculares disponíveis, sem fornecer subsídios para os rearranjos via interações intermoleculares S-H/S-S. Por outro lado, concentrações maiores de L-cisteína podem não ser necessárias uma vez que os locais de clivagem, bem como os rearranjos resultantes das reações de troca entre os grupamentos S-H/S-S podem ocorrer até determinado ponto, a partir do qual o aumento da concentração de L-cisteína será em vão.

Com base nestas possibilidades foram analisados os módulos ( $G'$ ,  $G''$  e  $\tan \delta$ ) das suspensões de gliadina com maiores concentrações de L-cisteína ( $1,5$  e  $3,0 \text{ \% (m/m de proteína)}$ ), na ausência e presença de plastificante (Figuras 5.20 a 5.23).

Foram constatadas que as principais mudanças estão justamente relacionadas aos valores do módulo ( $G'$ ) e ao tempo necessário para que a transição sol-gel ocorra. Ao se tomar como exemplo, as suspensões de gliadina com adição de  $1,5 \text{ \% (m/m de proteína)}$  com e sem glicerol (Figuras 5.20 e 5.21), observa-se nitidamente o efeito do plastificante na dependência do tempo para que transição sol-gel ocorra.

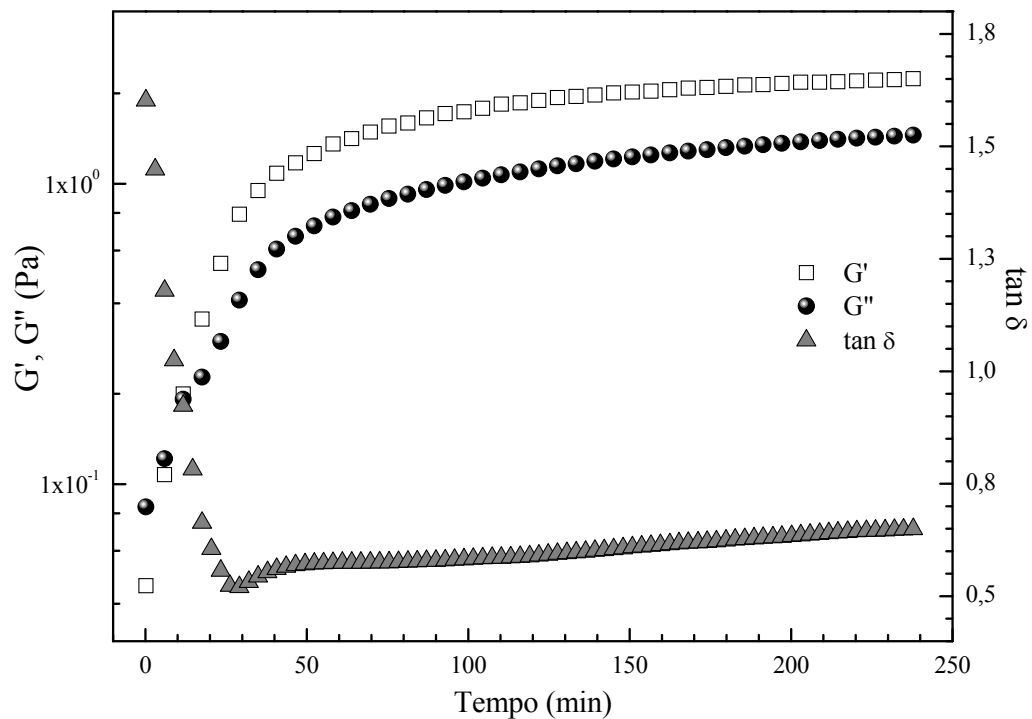


Figura 5.20 - Dependência de  $G'$ ,  $G''$  e  $\tan \delta$  em função do tempo para suspensões de gliadina ( $100 \text{ mg mL}^{-1}$ ) reticuladas com L-cisteína (1,5 % m/m) e sem adição de plastificante.

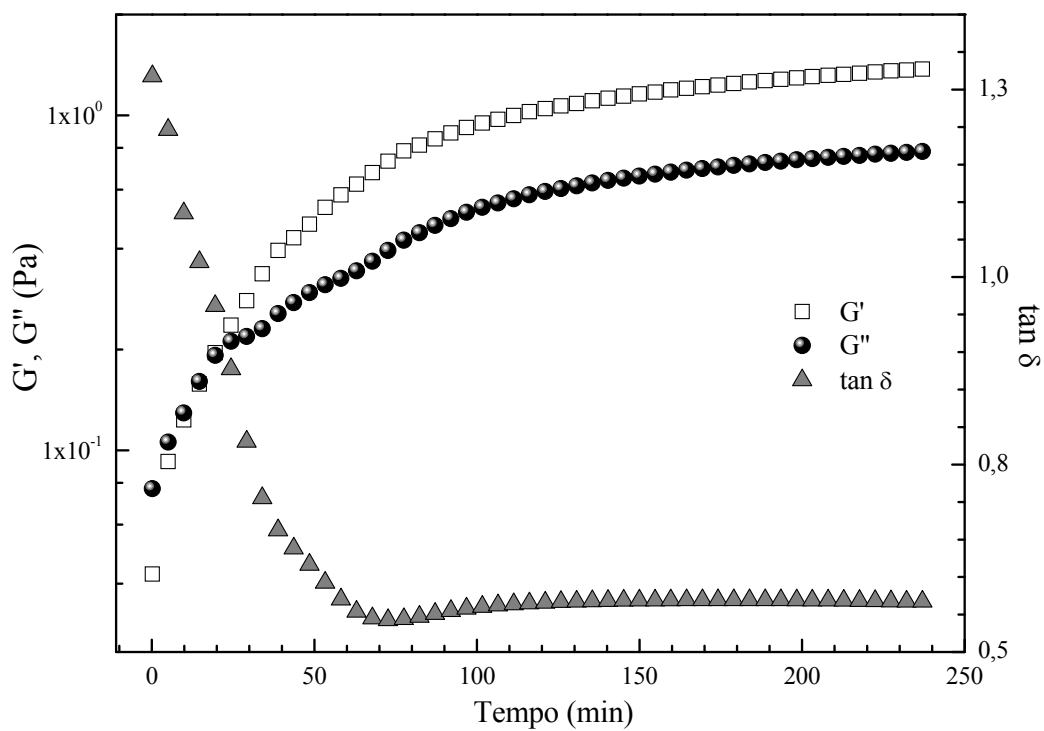


Figura 5.21 - Dependência de  $G'$ ,  $G''$  e  $\tan \delta$  em função do tempo para suspensões de gliadina ( $100 \text{ mg mL}^{-1}$ ) reticuladas com L-cisteína (1,5 % m/m) e com adição de plastificante (15 % m/m).

No entanto, ao serem analisadas suspensões com concentrações maiores de L-cisteína (3,0 m/m de proteína) (Figuras 5.22 e 5.23) com e sem glicerol, devem ser feitas ressalvas que vão além do tempo necessário para que a transição sol-gel ocorra, pois foram observadas também mudanças no valor do módulo das suspensões ( $G'$ ).

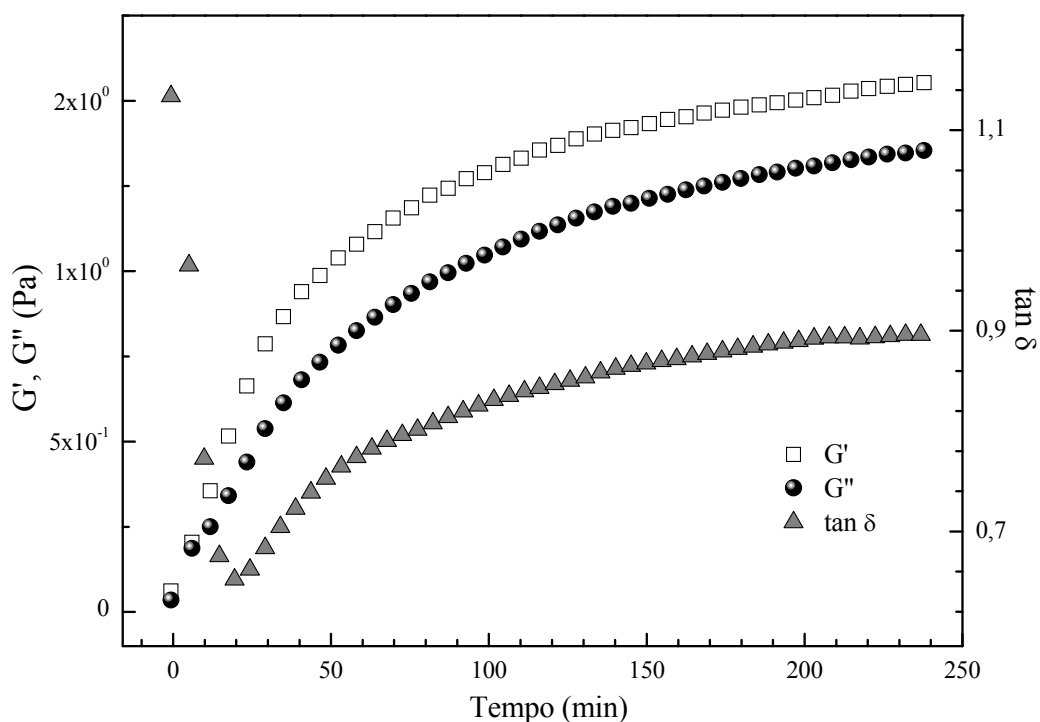


Figura 5.22 - Dependência de  $G'$ ,  $G''$  e  $\tan \delta$  em função do tempo para suspensões de gliadina (100 mg mL<sup>-1</sup>) reticuladas com L-cisteína (3,0 % m/m) e sem adição de plastificante.

Sendo assim, estas duas observações ( $G'$  e transição sol-gel) passaram a ser avaliadas como indicativos fundamentais nas mudanças de comportamento das suspensões, já que para os sistemas reticulados com L-cisteína, as mudanças de  $G'$  em função do tempo  $(dG'/dt)_T$  em condições isotérmicas estão diretamente relacionadas às transições sol-gel e, consequentemente, a extensão e ao grau de reticulação.



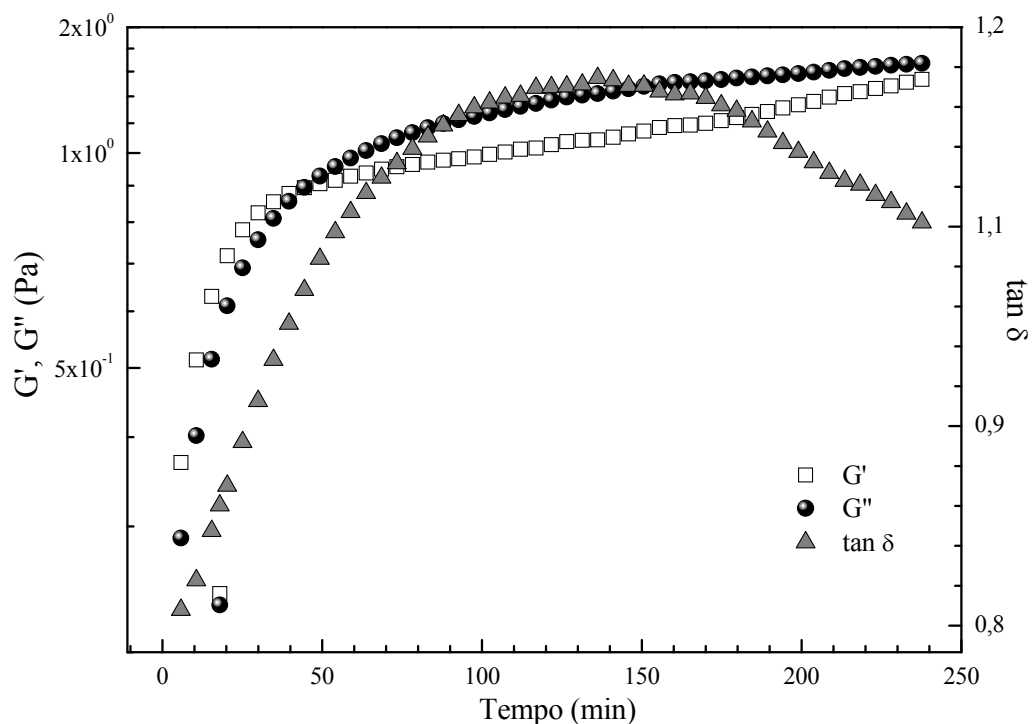


Figura 5.23 - Dependência de  $G'$ ,  $G''$  e  $\tan \delta$  em função do tempo para suspensões de gliadina ( $100 \text{ mg mL}^{-1}$ ) reticuladas com L-cisteína ( $3,0 \text{ \% m/m}$ ) e com adição de plastificante ( $15 \text{ \% m/m}$ ).

As Figuras 5.24 (a) e (b) mostram a dependência de  $(dG'/dt)_T$  em função do tempo a uma temperatura constante para as suspensões de gliadina reticuladas com diferentes concentrações de L-cisteína, em ausência e presença de glicerol, respectivamente. Para efeito de comparação, também estão ilustrados os sistemas não reticulados adicionados ou não de glicerol.

Na ausência de glicerol (Figura 5.24a), a suspensão com concentração  $3,0 \text{ \%}$  de L-cisteína ( $\text{m/m}$  de proteína) apresentou o seu ponto de inflexão ou ponto máximo já nos primeiros instantes após ser colocada no reômetro ( $t < 5 \text{ min}$ ), sendo seguida pelo sistema com  $1,5 \text{ \%}$  de L-cisteína ( $t = 10 \text{ min}$ ), pelo sistema não reticulado ( $t = 29 \text{ min}$ ) e finalmente pelo sistema com a menor concentração de L-cisteína empregada, aos  $55 \text{ min}$  de análise.

Com relação à curva  $dG'/dt$  para o sistema com  $3,0 \text{ \%}$  de L-cisteína observa-se que os primeiros pontos coletados encontram-se fora do limite de tempo estudado indicando que esta transição pode ter sido iniciada antes do início da análise. Durante o preparo das suspensões, as amostras foram homogeneizadas, colocadas em um banho termostatzado até alcançarem a temperatura de  $55 \text{ }^\circ\text{C}$  e somente então submetidas à análise. Portanto, supõe-se que o processo de transição sol-gel, assim como o processo de reticulação tenha sido iniciado precocemente.

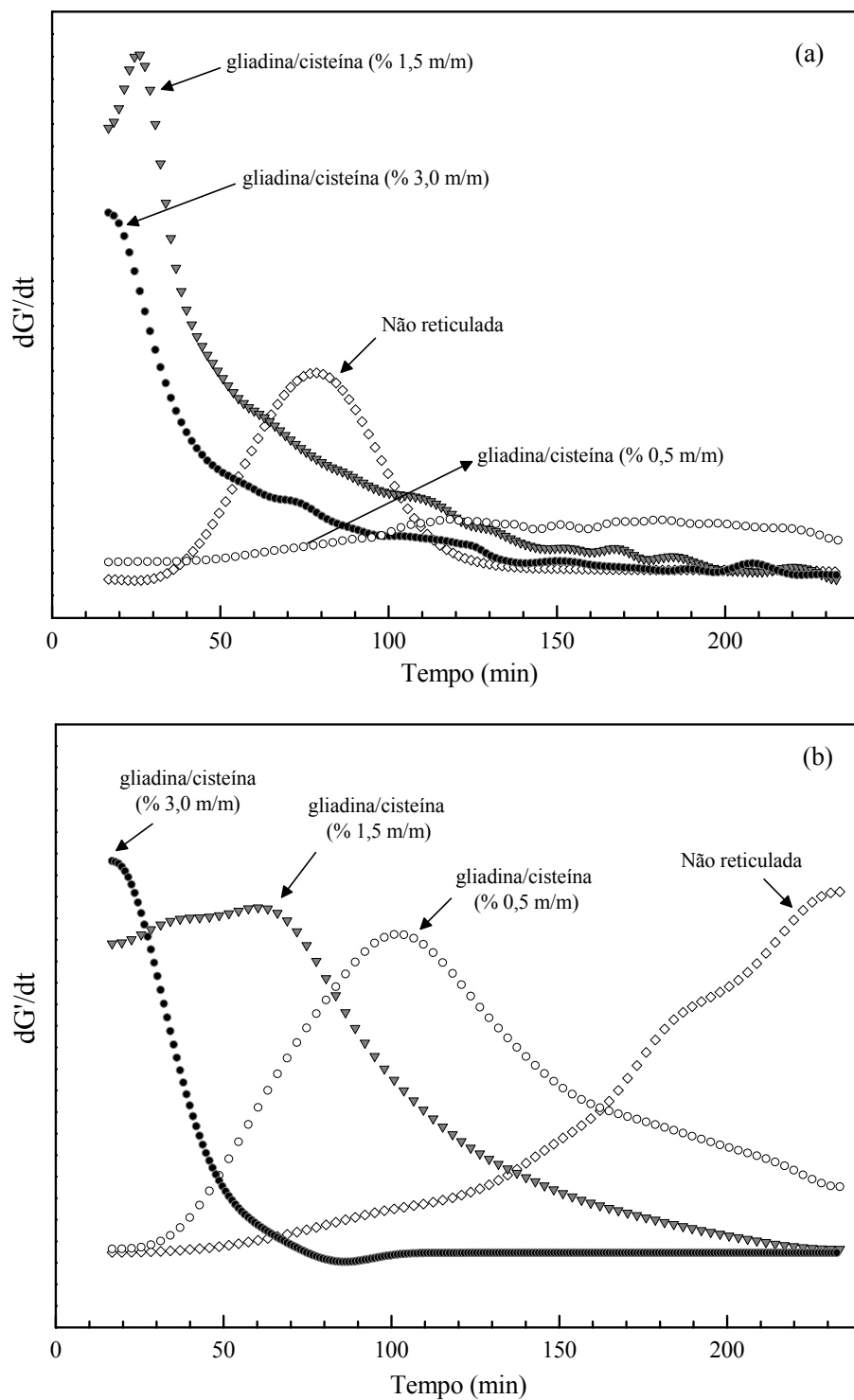


Figura 5.24 – (a) Dependência de  $dG'/dt$  em função do tempo a temperatura constante para as suspensões de gliadina ( $100 \text{ mg mL}^{-1}$ ) com diferentes concentrações de L-cisteína e na ausência de glicerol como plastificante. (b) Dependência de  $dG'/dt$  em função do tempo a temperatura constante para as suspensões de gliadina ( $100 \text{ mg mL}^{-1}$ ) com diferentes concentrações de L-cisteína e adicionadas de glicerol (15 % m/m de gliadina). As concentrações de L-cisteína empregadas aparecem indicadas nas Figuras.

A confirmação deste comportamento pode ser feita com base na Figura 5.22 que mostra os primeiros valores de  $\tan \delta$  maiores do que 1 ( $\tan \delta > 1$ ).

Processo semelhante parece ter ocorrido com a suspensão de gliadina com 1,5 % de L-cisteína, no entanto, em uma menor extensão. A área de sua curva  $dG'/dt$ , embora parcialmente visualizada, mostra os primeiros pontos antes de seu ponto de inflexão. Os valores iniciais de  $\tan \delta$  (Figura 5.20), por sua vez, são maiores que os observados anteriormente (Figura 5.22) indicando que embora numa escala menor, o processo de gelificação também ocorreu antes do início do ensaio.

De modo interessante, o ponto de transição sol-gel para a suspensão não reticulada foi anterior ao observado para a suspensão acrescida de 0,5 % de L-cisteína (m/m de gliadina) (5.24a). No entanto, ao ser observado o comportamento das curvas na Figura 5.18 nota-se um período maior de tempo até que os valores de  $G'$  e  $G''$  se cruzem. Durante este período de tempo, a presença de apenas 0,5 % de L-cisteína pode ter sido suficiente apenas para reduzir as ligações SH intracadeia existentes sem permitir o rearranjo intermolecular necessário para o extenso processo de reticulação. Neste caso, o aquecimento a 55 °C também pode ter sido útil, no entanto, a eficácia na transição sol-gel parece ter sido maior para o sistema não reticulado.

Embora tenham sido um indicativo, o parcial deslocamento dos pontos de inflexão nas curvas  $dG'/dt$  pôde mostrar somente a influência da concentração do reticulante na transição sol-gel. Apenas estas observações seriam insuficientes para a análise da eficiência do processo de reticulação. Para este fim, se faz necessário avaliar o módulo ( $G'$ ) e o seu valor máximo, que poderá indicar a magnitude do processo de reticulação através de possíveis rearranjos estruturais que tenham ocorrido com o tempo.

A Figura 5.25a mostra os valores de  $G'$  máximos em função de diferentes concentrações de L-cisteína e na ausência de glicerol. A magnitude dos valores de  $G'$  máximos adotou a seguinte ordem decrescente, baseada na concentração de L-cisteína empregada: 1,5 > 3,0 > NR > 0,5; enquanto que o tempo necessário (também em ordem decrescente) para que a transição sol-gel ocorresse se deu conforme a sequência: 0,5 > NR > 1,5 > 3,0. Embora o comportamento elástico representado por  $G'$  tenha sido maior na suspensão com 1,5 %; esta não necessitou de mais tempo, comparada as demais suspensões, para atingir sua transição sol-gel. Já a suspensão com a menor concentração de L-cisteína, necessitou de um tempo maior para que sua TSG fosse alcançada e, ao contrário do que seria

esperado, o seu valor de  $G'$  foi o menor.

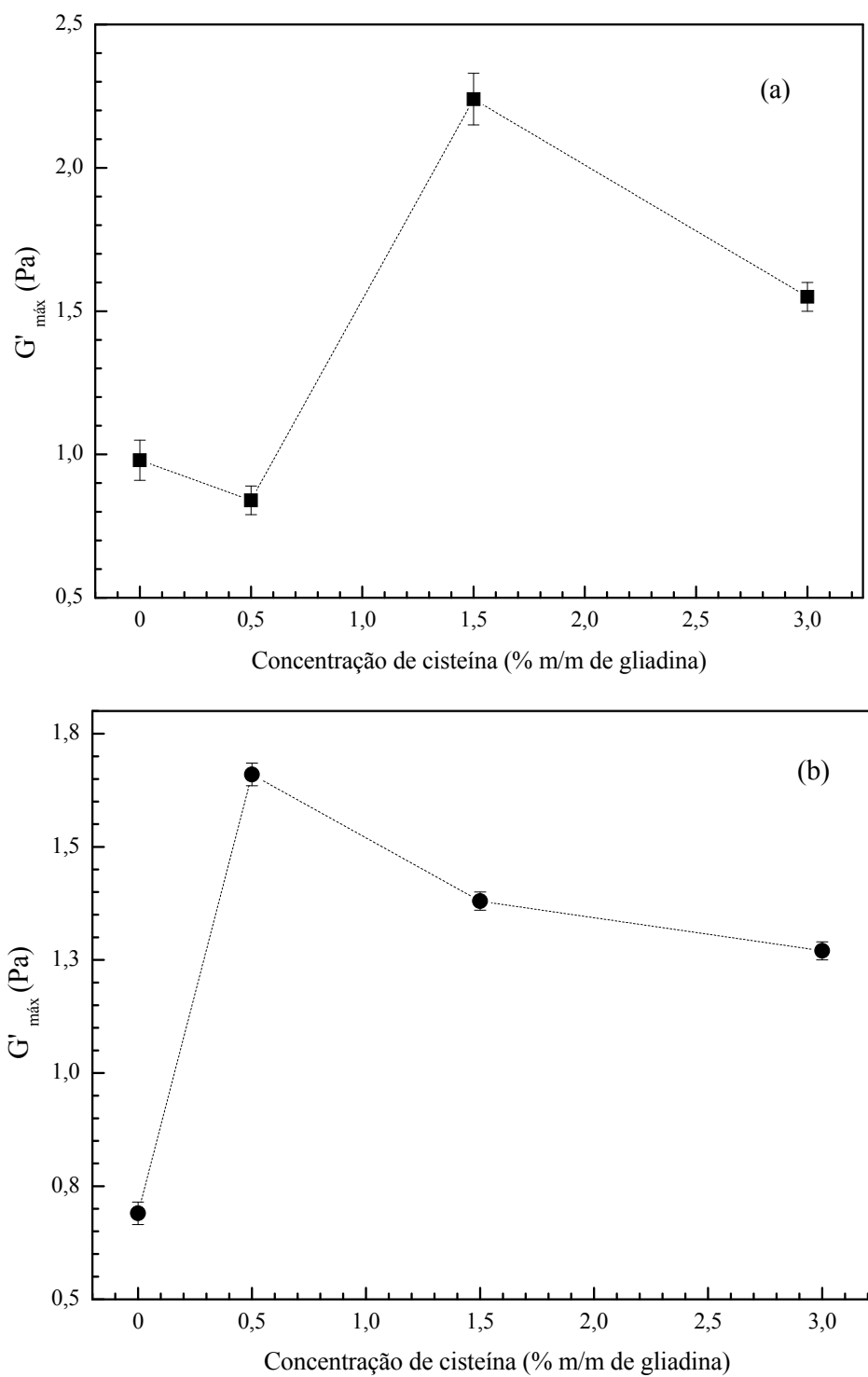


Figura 5.25 – Valores de  $G'$  máximos para as suspensões de gliadina ( $100 \text{ mg mL}^{-1}$ ) com diferentes concentrações de L-cisteína (a) ausência (b) e na presença de glicerol como plastificante.

Estes resultados podem estar demonstrando que os valores de  $G'$  máximos e o tempo necessário para a transição sol-gel, parecem ser variáveis independentes da concentração de L-cisteína empregada. Poder-se-ia até supor que quantidades maiores de L-cisteína não seriam necessárias para o aumento do comportamento elástico ( $G'$ ), podendo exercer algum efeito apenas na velocidade da transição sol-gel.

No entanto, o comportamento das curvas nas Figuras 5.18, 5.20 e 5.22, denota ainda a tendência ao aumento nos valores de  $G'$  nas concentrações de L-cisteína de 0,5 e 3,0 %. Ou seja, embora suas transições sol-gel já tenham ocorrido, interações moleculares e rearranjos da cadeia parecem estar acontecendo em função do tempo, sem ter alcançado ainda uma zona de estabilidade, o que significa que a sequência observada quanto aos valores de  $G'$  ainda pode ser alterada. Ao serem analisadas as mesmas suspensões, porém na presença de glicerol, alguns critérios foram elucidados uma vez que o comportamento das suspensões parece ter mudado significativamente com a adição do glicerol (Figura 5.24b e 5.25b). A ordem decrescente do tempo necessário para a transição sol-gel e os valores de  $G'$  máximos ocorreram da seguinte forma, respectivamente: ( $t = \min$ ) NR > 0,5 > 1,5 > 3,0 e ( $G'_{\max}$ ) 0,5 > 1,5 > 3,0 > NR.

Em presença de plastificante, a transição sol-gel parece ter sido dependente da concentração de L-cisteína ao passo que os valores de  $G'$  máximos passaram a ser dependentes, porém, sua ordem foi diferente daquela observada na transição sol-gel. Em outras palavras, a suspensão não reticulada além de ter necessitado de mais tempo para o aparecimento de sua TSG, também obteve o menor valor de  $G'$ . No entanto, nas amostras reticuladas, o tempo necessário para a TSG passou a ser dependente da concentração de L-cisteína e, ao contrário do sistema em ausência de glicerol, a estabilidade nas curvas  $G'$  e  $G''$  parece estar sendo alcançada mais rapidamente.

A adição de glicerol ao sistema parece ter facilitado à L-cisteína o seu acesso a locais específicos e interações intra e intermoleculares que contribuíssem para o rápido aumento de  $G'$ , basta que para isto sejam comparados os valores de  $G'$  máximos na ausência e presença de glicerol a 0,5 % de L-cisteína.

No entanto, ao se trabalhar com concentrações de L-cisteína maiores, embora a transição sol-gel tenha cedido à lógica da concentração de L-cisteína, o tempo de análise pode não ter sido suficiente para que as suspensões atingissem seus valores máximos de  $G'$ , o que indica que possíveis interações intermoleculares ainda estejam ocorrendo e sejam dependentes

do tempo.

Como exemplo deste comportamento está a suspensão com 3,0 % de L-cisteína que além de ter apontado o menor módulo elástico ( $G'$ ) em comparação a concentrações menores, na presença de glicerol, após alcançar sua transição sol-gel passa a apresentar um comportamento mais viscoso do que elástico ( $G'' > G'$ ) e esta tendência segue aumentando com o tempo, quando é possível observar que  $G'$  cruzará novamente  $G''$ .

Ao se trabalhar com concentrações de L-cisteína acima de 1,5 % (m/m de gliadina), a reticulação do sistema torna-se instável e até reversível, como observado na presença de glicerol. Sobre esta suposição pode-se inferir que quantidades muito altas de L-cisteína sejam apenas eficazes na velocidade de formação do gel e não no comportamento elástico da suspensão. Nesta concentração, a L-cisteína parece interagir rapidamente nos locais disponíveis para as reações de troca entre os grupamentos sulfidríla – SS. A formação de um agregado maior se dá rapidamente, promovendo uma espécie de saturação dos locais disponíveis, no entanto, parece não deixar espaço entre as cadeias para que novas interações moleculares ocorram e resultem no aumento do comportamento elástico da suspensão.

Em concentrações menores (0,5 e 1,5 % m/m de gliadina), estas interações tornaram-se facilitadas e a adição do glicerol, embora tenha contribuído para maior rapidez na estabilidade da suspensão, parece ter reduzido o comportamento elástico dos sistemas. Acredita-se que o espaçamento resultante entre as cadeias, em função da presença do plastificante (aumento do volume livre) tenha tornado dificultosas as interações intermoleculares, acabando por resultar em valores de módulo menores que aqueles em ausência de glicerol.

O glicerol também parece ter contribuído para maiores interações entre as cadeias na presença de 0,5 % de L-cisteína. O aumento da concentração de L-cisteína (1,5 %) parece de fato, ter contribuído para a velocidade na transição sol-gel e, também na formação de um agregado molecular, no entanto, parece ter limitado a possibilidade de interações intermoleculares que resultariam em valores de módulo maiores. Na ausência de glicerol, esta transição não se dá de maneira tão rápida, possibilitando maior interação intermolecular.

#### *5.4 Conclusões Parciais*

A presença de glicerol nas suspensões nativas e também nas suspensões reticuladas por [EDC/NHS] e L-cisteína, mostrou ter influência significativa nas curvas de viscosidade.

No entanto, a suspensão formada por gliadina e L-cisteína apresentou maior viscosidade, comprovando o efeito da L-cisteína na reticulação. No sistema não reticulado ou nativo (Sistema A), o aumento da concentração de glicerol reduziu os valores de viscosidade e o mesmo comportamento foi encontrado na suspensão modificada pela presença de L-cisteína. Os padrões observados nos perfis das curvas de viscosidade tanto para o sistema nativo quanto aquele reticulado por L-cisteína (Sistema B), mostraram-se semelhantes e, além disso, ambos variaram significativamente com o aumento na taxa de cisalhamento; comportamento este, característico de materiais pseudoplásticos.

No entanto, o sistema B (gliadina/[EDC/NHS]), revelou-se dependente não somente do cisalhamento, mas também do tempo, e suas curvas apresentaram uma volta característica ou *looping*, referente ao fenômeno de histerese, dependendo da concentração de glicerol empregada. Seus valores de viscosidade foram os menores observados em comparação aos sistemas A e C e sugere-se que este comportamento possa ser explicado, em parte, pela estrutura do EDC, solúvel em água e com um íon monovalente considerado grande como o íon cloreto ( $\text{Cl}^-$ ). Acredita-se portanto que presença de suas cargas difusas na superfície possa fazer com que as moléculas de água sejam polarizadas somente na primeira camada de hidratação, reduzindo consequentemente a viscosidade para valores inferiores.

A dependência de  $G'$ ,  $G''$  e  $\tan \delta$  em função do tempo nos experimentos oscilatórios revelou que o sistema A, tanto na ausência quanto presença de glicerol, apresentaram transições sol-gel e ainda, a presença de três regiões ou domínios no padrão de suas curvas. A primeira região, caracterizada como um período de indução no qual  $G'$  e  $G''$  não mudam significativamente com o tempo; a segunda, na qual inicia-se a estrutura da rede tridimensional e o módulo elástico ( $G'$ ) aumenta paulatinamente com o tempo, e a região III, onde constata-se diferenças no sistema A quanto a estabilidade do gel formado, em função da presença ou ausência de glicerol.

O sistema gliadina/[EDC/NHS] na concentração 3,0 % de reticulante (m/m de gliadina), apresentou os maiores valores de módulo ( $G'$  e  $G''$ ), seguidos pelas concentrações 1,5; 6,0 % e 12 %. Para toda a faixa de concentração de reticulante empregada foi observado o brando aumento de  $G'$  em função do tempo, enquanto que as mudanças para  $G''$  seguiram o mesmo comportamento em ordem de grandeza maior, sem qualquer surgimento de transição sol-gel. Vários fatores foram discutidos neste capítulo e podem ter sido responsáveis pelo desencadeamento deste comportamento, no entanto, todos levam em consideração a possibilidade da formação de pequenos agregados localizados entre os espaços situados entre

as cadeias distribuídas randomicamente ( $G'' > G'$ ).

As suspensões de gliadina e L-cisteína com e sem a presença de glicerol, mostraram o aparecimento de uma transição sol-gel para a toda a faixa de concentração de L-cisteína empregada. A variação no aparecimento destas transições deu-se em função da concentração de L-cisteína e também mostraram certo grau de variação devido à presença de glicerol. Todavia, todas as mudanças ocorridas no comportamento da suspensão de gliadina em presença de L-cisteína estão relacionadas principalmente à formação de ligações dissulfeto intermoleculares durante o processo de solubilização das proteínas em pH básico. Por esta razão, considerou-se que a concentração de L-cisteína foi de fundamental importância no comportamento elástico das suspensões, e por esta razão, concentrações muito baixas ou demasiadamente altas podem ter levado à ineficiência no processo de reticulação.



## CAPÍTULO 6

# PROPRIEDADES TÉRMICAS E ESPECTROSCÓPICAS DE FILMES DE GLIADINA RETICULADOS PELA ADIÇÃO DE HIDROCLORETO DE 1-(3-DIMETILAMINOPROPIL-3-ETIL-CARBODIIMIDA)/N-HIDROXISUCCINAMIDA E L-CISTEÍNA

### 6.1 *Resumo*

Neste capítulo será abordado o estudo dos filmes formados a partir de suspensões compostas por gliadina nativa, gliadina reticulada por [EDC/NHS] e também por L-cisteína. Será avaliado o efeito da adição de diferentes concentrações de glicerol aos filmes formados. As análises empregadas compreendem estudos por calorimetria diferencial exploratória (DSC), análise termogravimétrica (TG ou TGA) e espectroscopia na região do infravermelho (FTIR).

Espera-se que as mudanças em nível molecular que tenham ocorrido em suspensão possam continuar ocorrendo em diferente extensão no processo de evaporação dos filmes. Baseando-se nesta hipótese poderão ser acompanhadas transições características ( $T_g$ ) e prováveis mudanças na estabilidade térmica dos mesmos. Por fim, a análise espectral na região do infravermelho irá auxiliar no estudo de prováveis mudanças ocorridas na estrutura secundária da proteína. Estas mudanças conformacionais poderão ter sido provocadas pela ação do aquecimento, do plastificante e/ou dos diferentes agentes de reticulação. A análise detalhada dos espectros, sobreposição de bandas e a razão para os principais picos de absorção observados serão também realizados.

### 6.2 *Procedimento Experimental*

#### 6.2.1 *Material*

A descrição do material utilizado neste capítulo bem como o preparo das suspensões de proteína pode ser encontrada nos itens 4.1.1 e 4.1.2 do capítulo 4.

#### 6.2.2 *Preparo dos Filmes*

As suspensões de gliadina nativa (Sistema A) foram preparadas na concentração 100

mg mL<sup>-1</sup> em uma mistura de água destilada/etanol (40/60 v/v) com a adição de diferentes concentrações de glicerol (0, 5, 10, 15 e 20 % m/m de gliadina) e mantidas sob agitação constante por 55 °C durante aproximadamente 30 minutos, decorrido este período, eram mantidas a temperatura ambiente por um período de 6 horas. As suspensões de gliadina reticuladas foram preparadas conforme descrição para o para sistema A, porém, com a posterior adição dos agentes de reticulação [EDC/NHS] (3 % m/m de gliadina) ou L-cisteína (1,5 % m/m de gliadina), os quais fizeram parte dos sistemas denominados, sistema B e C, respectivamente. Após o resfriamento das suspensões, 25 mL eram transferidos para placas de teflon (12 cm de diâmetro) e deixados em capela de exaustão, sob temperatura ambiente por aproximadamente 12 horas para evaporação do solvente. Os filmes formados foram removidos das placas, secos em estufa à vácuo por 24 horas, transferidos para o dessecador, de onde então seguiam para as análises. Para facilitar a interpretação dos resultados frente às diferentes composições empregadas, os filmes receberam denominações específicas que estão de acordo com a Tabela 5.1 (Capítulo 5).

#### *6.2.3 Calorimetria Diferencial Exploratória [DSC]*

As temperaturas de transição vítrea ( $T_g$ ) dos filmes formados foram determinadas por calorimetria exploratória diferencial (DSC) num aparelho DSC-50, Shimadzu, calibrado com índio ( $T_m = 156,6$  °C) e zinco ( $T_m = 419,5$  °C). Aproximadamente 8 – 10 mg das amostras foram colocados em porta amostras de alumínio, aquecidas a 10 °C min<sup>-1</sup> sob atmosfera de nitrogênio (50 cm<sup>3</sup> min<sup>-1</sup>) até 190 °C. A fim de se eliminar a história térmica das amostras, as mesmas foram retiradas do equipamento, submetidas ao tratamento por choque térmico com nitrogênio líquido e então analisadas em uma segunda varredura de 25 °C a 250 °C (10 °C min<sup>-1</sup>). A temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ) foi obtida no ponto de inflexão entre as linhas bases causado pela variação da capacidade calorífica da amostra.

#### *6.2.4 Termogravimetria [TG]*

A estabilidade térmica dos filmes obtidos (Tabela 5.1, Cap. 5) foi realizada em um analisador termogravimétrico, modelo TGA-50 Shimadzu. Amostras de aproximadamente 10 mg foram colocadas em um porta amostras de platina (Pt) e submetidas a taxas de aquecimento de 10 °C min<sup>-1</sup> entre 25 °C a 600 °C sob atmosfera de nitrogênio (fluxo de 50 cm<sup>3</sup> min<sup>-1</sup>). Os dados de perda de massa em função da temperatura e sua derivada (DTG)

foram analisados.

### 6.2.5 Espectroscopia no Infravermelho [FTIR]

A análise de espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) foi realizada em filmes finos e secos sob placas de silício. O espectro de infravermelho foi obtido em um equipamento Perkin-Elmer PC-16 com transformada de Fourier, resolução de  $4\text{ cm}^{-1}$  na faixa situada entre  $4000$  a  $400\text{ cm}^{-1}$ .

### 6.3 Resultados e Discussão

A temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ) é um importante parâmetro na determinação de estabilidade de um material durante seu manuseio e estocagem.<sup>94</sup> Além disso, o concomitante uso de plastificantes na elaboração de filmes proporciona redução das forças intermoleculares e o aumento da mobilidade das cadeias poliméricas, aumentando por conseguinte, a sua flexibilidade e extensibilidade.<sup>95</sup> Com base nestas afirmações, foram incorporadas diferentes concentrações de glicerol aos filmes de gliadina nativa e reticulada e o comportamento da  $T_g$  em função do conteúdo de plastificante pode ser acompanhado através da Figura 6.1.

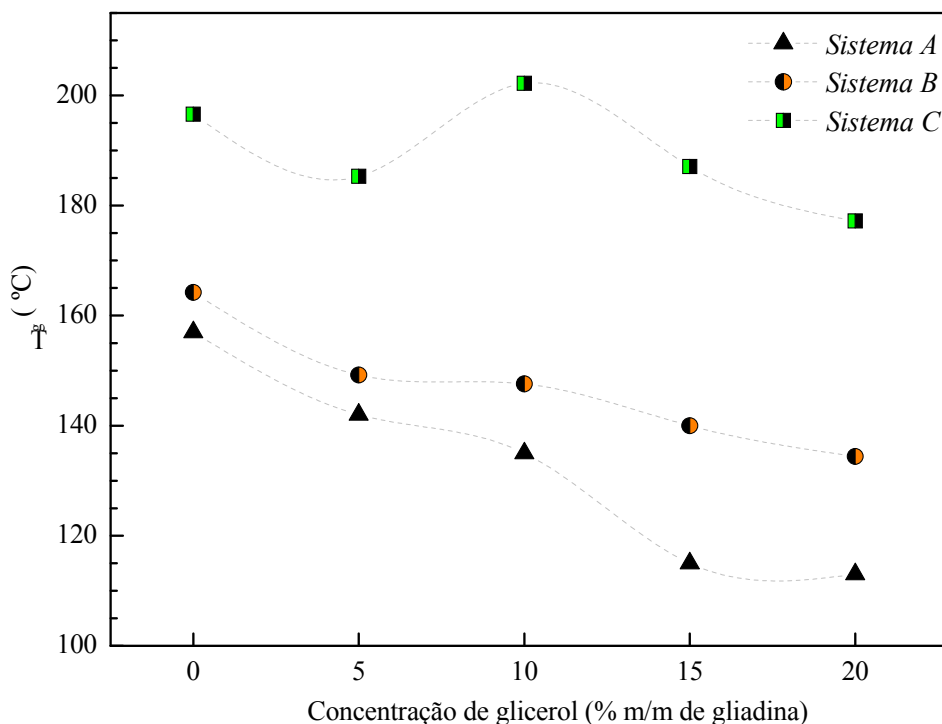


Figura 6.1 - Temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ) em função da concentração de glicerol (% m/m de gliadina) para filmes de gliadina não reticulados (Sistema A), reticulados com [EDC/NHS] (Sistema

B) e reticulados com L-cisteína (Sistema C).

O sistema A, composto apenas por filmes de gliadina não reticulados, sofreu decréscimo em seus valores de  $T_g$ , de 157 para aproximadamente 113 °C, em função da adição de glicerol, o que já era esperado em função do espaço entre as cadeias. Entretanto, para os filmes reticulados (Sistemas B e C), apesar de ter sido observada a mesma tendência no deslocamento da  $T_g$ , foram detectados valores superiores aos filmes de gliadina não reticulada. Este comportamento pode estar relacionado aos diferentes graus de restrição nos movimentos das cadeias pelas ligações intermoleculares, ao serem adicionados os diferentes agentes de reticulação.

Os filmes compostos por gliadina e L-cisteína apresentaram os maiores valores de  $T_g$ , sendo seguidos pelo sistema B e A, respectivamente. Porém, de maneira inesperada, o sistema C apresentou um aumento em sua  $T_g$  em presença de 10 % de glicerol, voltando a decair em concentrações maiores de glicerol. Este comportamento pode ser explicado pela conformação da proteína, adquirida ao longo do preparo da suspensão, adição do reticulante, glicerol e evaporação do filme. Uma conformação mais enovelada, com poucos resquícios de estruturas estendidas pode estar refletindo em mudanças nas transições térmicas observadas. Portanto, variações específicas de plastificante podem estar facilitando ou dificultando este comportamento. Estes aspectos serão discutidos com maior ênfase nas análises espectroscópicas realizadas posteriormente aos estudos de estabilidade térmica.

No entanto, cabe ressaltar que os diferentes graus de reticulação alcançados pelos sistemas B e C proporcionaram a formação de filmes, cujas moléculas em suspensão revelaram elasticidades distintas, representadas pelos valores dos módulos elástico ( $G'$ ) e de perda ( $G''$ ). Esta diferença na elasticidade, ou em outras palavras, na restrição de mobilidade das cadeias através das interações moleculares, parece ser o “fator chave” para o aumento dos patamares energéticos da transição vítrea nos sistemas reticulados.

Por outro lado, a estabilidade térmica de um material também pode ser afetada pelo nível de reticulação de suas macromoléculas e pela presença de outras substâncias, como plastificantes. As variações de massa em função da temperatura para os filmes de gliadina não reticulados são mostrados na Figura 6.2.

Inicialmente pode ser observado um estágio de decomposição entre 260-280 °C que pode ser atribuído a evaporação do plastificante utilizado (glicerol). Por outro lado, a gliadina se decompõe em um único estágio na região entre 310-410 °C. Com o aumento de glicerol na

composição dos filmes, observou-se um decréscimo nas temperaturas de decomposição máxima ( $T_{máx}$ ) até valores próximos de 335 °C. Este comportamento pode estar relacionado ao aumento do volume livre o qual propicia maior velocidade de difusão de produtos gasosos formados durante a decomposição, acelerando assim este processo.

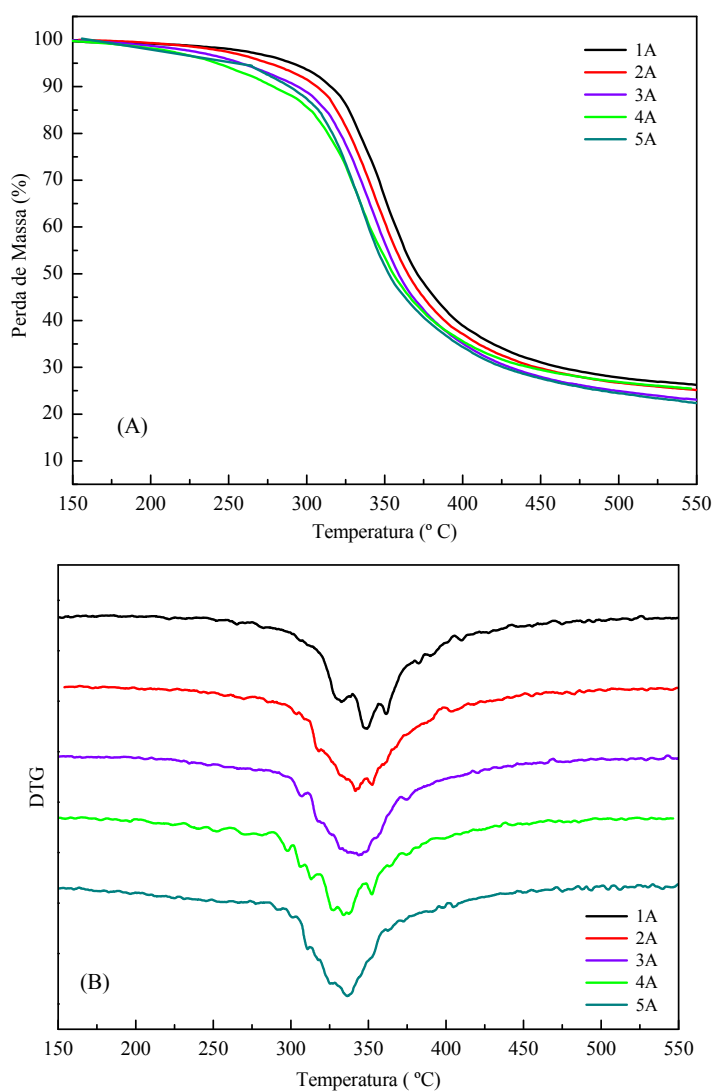


Figura 6.2 – Curvas termogravimétricas (A) e (B) DTG para os filmes de gliadina não reticulados e adicionados de diferentes concentrações de glicerol (1A (zero), 2A (5 % m/m), 3A (10 % m/m), 4A (15 % m/m) e 5A (20 % m/m)).

O mesmo estágio de perda de glicerol pôde ser observado nas curvas termogravimétricas para o sistema reticulado com [EDC/NHS] (Figura 6.3). Para estes filmes, apesar da presença do reticulante, a gliadina continua a se decompor em um único estágio. Entretanto, ao contrário do observado anteriormente, a adição do glicerol parece não provocar

variações significativas no processo degradativo. Os valores de  $T_{máx}$  mantiveram-se praticamente constantes na faixa situada entre 333-340 °C para os filmes cuja concentração de glicerol variou de zero a 20 %. Neste sistema acredita-se que o volume livre seja menor do que para a gliadina não reticulada. No entanto, a variação de volume livre é menor quando comparada ao sistema A e, conseqüentemente, o deslocamento no processo de degradação é minimizado. Esta suposição está amparada tanto na variação da  $T_g$  para o sistema reticulado com [EDC/NHS], quanto no comportamento reológico deste sistema (Capítulo 5), devido ao modelo proposto, ao espaçamento entre as cadeias e as curvas de  $G'$  e  $G''$ .

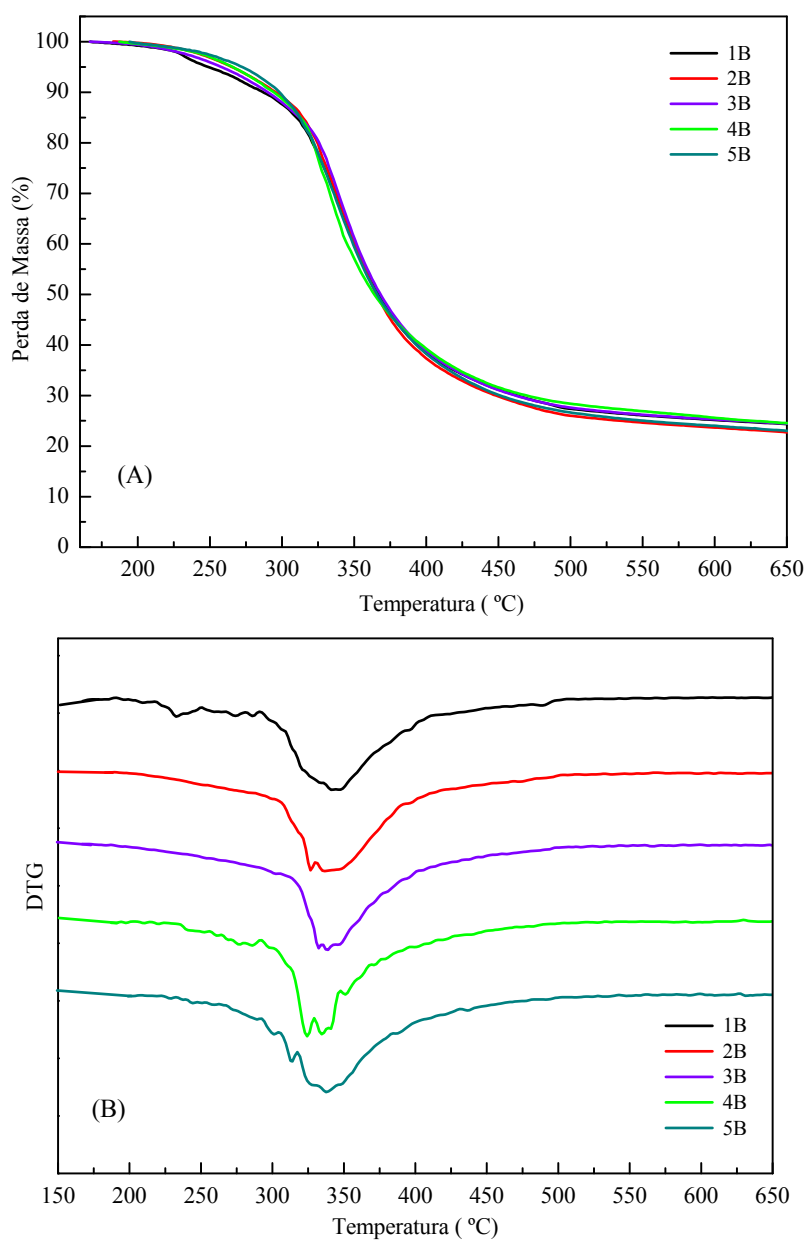


Figura 6.3 – Curvas termogravimétricas (A) e (B) DTG para os filmes de gliadina reticulados com [EDC/NHS] (3,0 % m/m de gliadina) e adicionados de diferentes concentrações de glicerol (1B (zero), 2B (5 % m/m), 3B (10 % m/m), 4B (15 % m/m) e 5B (20 % m/m)).

Para o sistema reticulado com L-cisteína, o mesmo estágio de perda de glicerol foi observado (Figura 6.4). Além disso, a gliadina continua a se decompor em apenas um estágio. Por outro lado, surpreendentemente, após a adição de 15 % de glicerol, ocorre um amplo deslocamento na estabilidade térmica da gliadina, nesta ocasião, parece estar ocorrendo uma mudança estrutural significativa, que também pôde ser observada com a mudança abrupta na  $T_g$  (Figura 6.1).

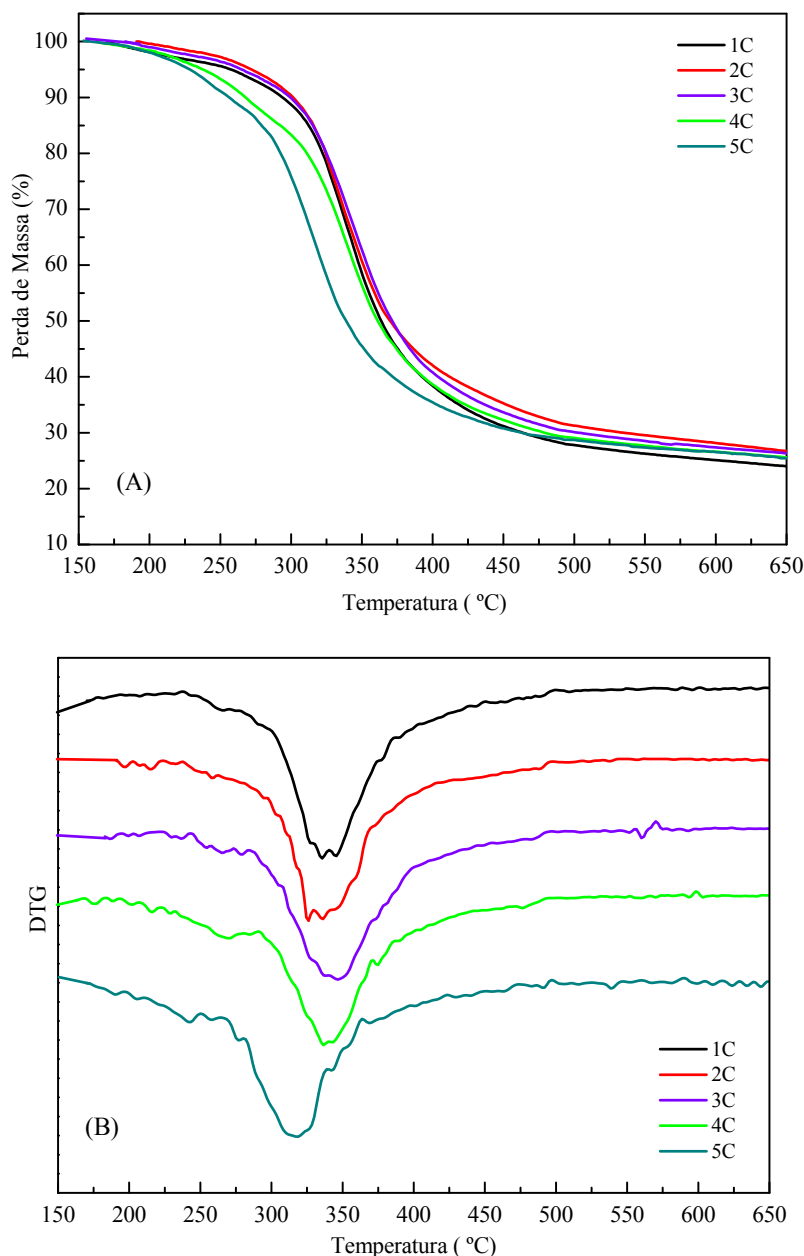


Figura 6.4 – Curvas termogravimétricas (A) e DTG (B) para os filmes de gliadina reticulados com L-cisteína (1,5 % m/m de gliadina) e adicionados de diferentes concentrações de glicerol (1C (zero), 2C (5 % m/m), 3C (10 % m/m), 4C (15 % m/m) e 5C (20 % m/m)).

Os parâmetros termogravimétricos para os três sistemas encontram-se resumidos na

Tabela 6.1. Os valores de perda de massa mantiveram-se constantes em torno de 70 % na temperatura de decomposição máxima. Por outro lado, conforme esperado, a quantidade de massa residual diminuiu com o aumento da quantidade de plastificante.

Tabela 6.1 – Parâmetros termogravimétricos para os sistemas A (Não reticulado), B (gliadina/EDC/NHS/glicerol) e C (gliadina/cisteína/glicerol).

Sistemas	Estágio II		Massa residual (%)
	$T_{máx}$ (°C) <sup>a</sup>	PM (%) <sup>b</sup>	
<b>1A</b>	347,2	69,2	26,3
<b>2A</b>	341,4	68,6	25,2
<b>3A</b>	340,7	64,8	23,1
<b>4A</b>	333,4	66,1	25,5
<b>5A</b>	334,8	64,7	22,4
<b>1B</b>	338,5	68,8	24,4
<b>2B</b>	339,6	68,5	22,8
<b>3B</b>	338,8	70,2	24,5
<b>4B</b>	332,8	73,3	24,5
<b>5B</b>	337,8	68,5	23,0
<b>1C</b>	338,9	66,2	24,0
<b>2C</b>	338,1	70,8	27,0
<b>3C</b>	343,4	67,1	26,4
<b>4C</b>	339,5	63,6	25,6
<b>5C</b>	317,2	63,8	25,5

<sup>a</sup> Temperatura de máxima degradação

<sup>b</sup> Perda de massa na temperatura de máxima degradação (650 °C)

Como discutido anteriormente, a adição de glicerol aos sistemas provocou uma



redução da estabilidade térmica nos filmes de gliadina. No sistema A esta queda se deu de maneira constante, enquanto que para o sistema B esta queda foi menos pronunciada e para o sistema C observou-se uma significativa desestabilização térmica para concentrações elevadas de plastificante.

Acredita-se que este comportamento esteja relacionado com o volume livre das macromoléculas de gliadina, ou seja, ao elevar-se a concentração de glicerol há um favorecimento das interações proteína-plastificante em detrimento das interações proteína-proteína. Ante este fato, os segmentos das cadeias de gliadina movimentam-se com maior liberdade durante o aquecimento, provocando maiores polarizações das ligações peptídicas e consequentemente, uma redução na estabilidade térmica.

Estes compostos de baixa massa molar podem ter sido formados por quebras de ligações covalentes entre os resíduos de aminoácidos, resultando no aumento de massa residual a temperaturas de degradação maiores. Finalmente, a temperaturas ainda maiores (acima de 340 °C) podem ter ocorrido quebra de ligações S-S, O-N e O-O, presentes na proteína.<sup>96</sup> Com o intuito de se avaliar as possíveis modificações na estrutura da gliadina foram realizadas análises espectroscópicas na região do infravermelho. As Figuras 6.5A e 6.5B mostram os espectros dos filmes de gliadina não reticulados submetidos e/ou não ao aquecimento, respectivamente. De maneira geral, os filmes não reticulados apresentaram bandas nas regiões de número de onda situado entre 2800-3600  $\text{cm}^{-1}$ . Estas bandas são atribuídas às vibrações de estiramento de O-H e N-H livres, enquanto que uma pequena banda em 2800-3000  $\text{cm}^{-1}$  é atribuída ao estiramento C-H.

Do mesmo modo, ambos apresentaram na região de 1072  $\text{cm}^{-1}$  uma banda característica de estiramento C-N de aminas; além de apresentarem bandas de absorção mais específicas na região de amida I (1650  $\text{cm}^{-1}$ ), relacionadas à vibração do estiramento C=O e C-N e; amida II, referente à deformação angular N-H (1540 e 1560  $\text{cm}^{-1}$ ) e estiramento C-N. A região de absorção da amida I pode estar englobando a sobreposição de diversos componentes devido aos vários tipos de segmentos de proteínas, com diferentes conformações em sua estrutura secundária. Por esta razão, é a região mais estudada na avaliação de modificações estruturais.

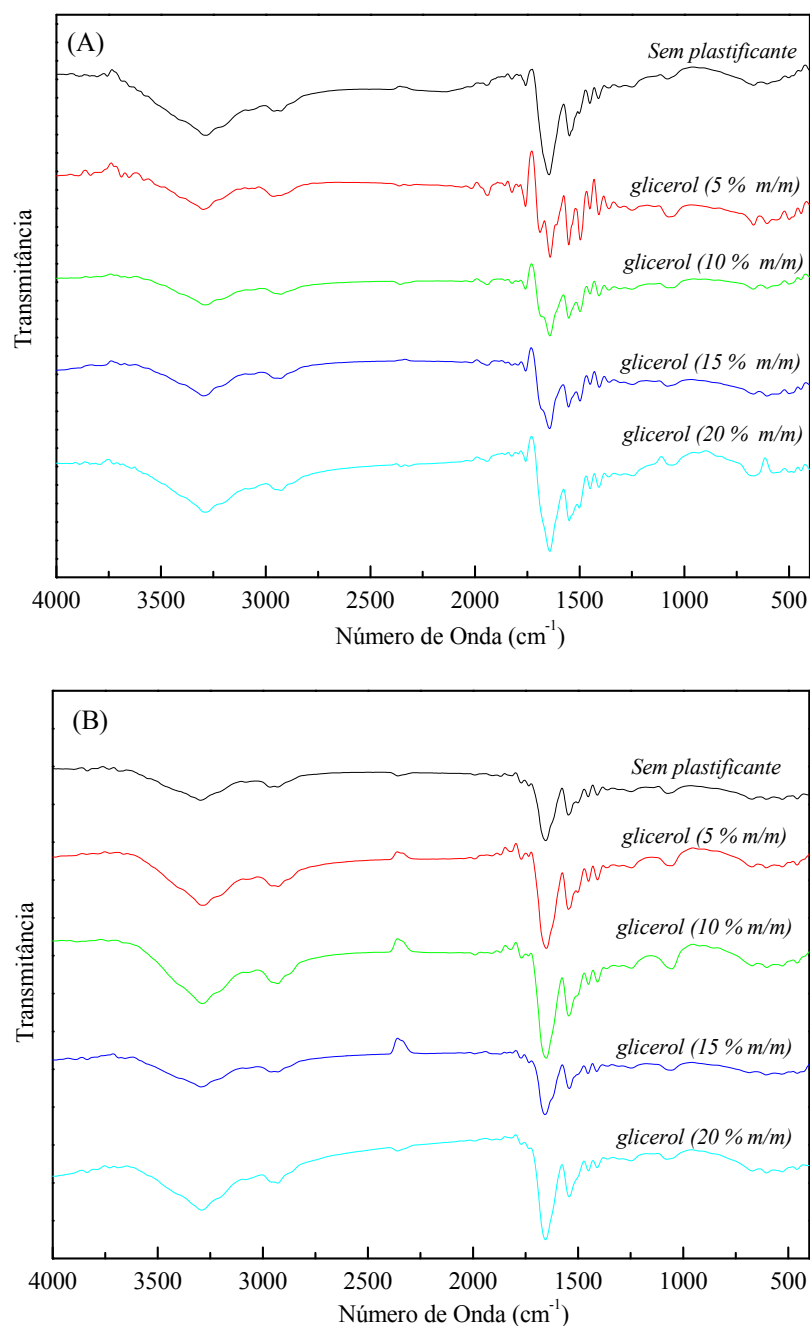


Figura 6.5 – Espectros de infravermelho para os filmes de gliadina (A) não reticulados e sem aquecimento e (B) não reticulados e com aquecimento.

O resultado de uma análise mais detalhada na região do espectro referente a amidas I, bem como o efeito da adição de glicerol e do tratamento térmico nas suspensões formadoras dos filmes, pode ser visualizado nas Figuras 6.6 e 6.7, respectivamente.

A Figura 6.6 ilustra os espectros dos filmes formados sem adição do plastificante, com e sem aquecimento. A presença de bandas de absorção em  $1670\text{ cm}^{-1}$  e  $1650\text{ cm}^{-1}$  pode estar indicando a presença de confôrmeros  $\beta$ , além dos domínios de gliadina ricos em resíduos de prolina, os quais supostamente contribuem para esta estrutura. Já a banda em  $1620\text{ cm}^{-1}$  pode estar relacionada à deformação angular do grupamento  $\text{NH}_2$  presente nas cadeias laterais da glutamina. A banda na região de  $1650\text{ cm}^{-1}$  também é fortemente atribuída à conformação  $\alpha$ -hélice enquanto que vestígios menores a  $1620$  e  $1618\text{ cm}^{-1}$  são característicos de grupos amida presentes nas folhas  $\beta$ , bem como, bandas características e inerentes às respectivas diferenças quanto à natureza das ligações de hidrogênio em suas fitas.

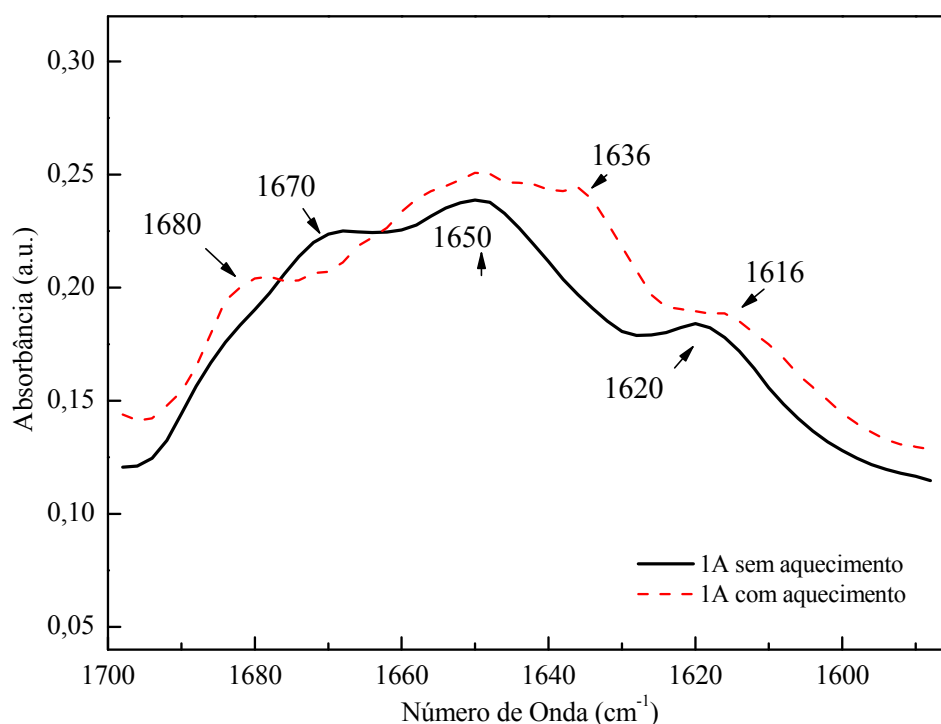


Figura 6.6 – Sobreposição dos espectros de infravermelho para os filmes de gliadina sem adição de glicerol, não aquecidos e aquecidos a  $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

O efeito da adição do glicerol aos filmes pode ser observado na Figura 6.7. Corroborando com estudos realizados por Mangavel *et al.*,<sup>56</sup> os pequenos deslocamentos observados no espectro ao se comparar as Figuras 6.6 e 6.7, não foram considerados significativos, o que comprova que o plastificante não contribui para modificações na estrutura secundária da proteína, colaborando apenas para as ligações de hidrogênio na molécula da gliadina. Ao contrário, o efeito da temperatura parece induzir um deslocamento

significativo nas bandas, e este efeito foi observado tanto na ausência quanto na presença de glicerol e mostra que a temperatura pode estar favorecendo rearranjos estruturais em busca de uma conformação mais estável.

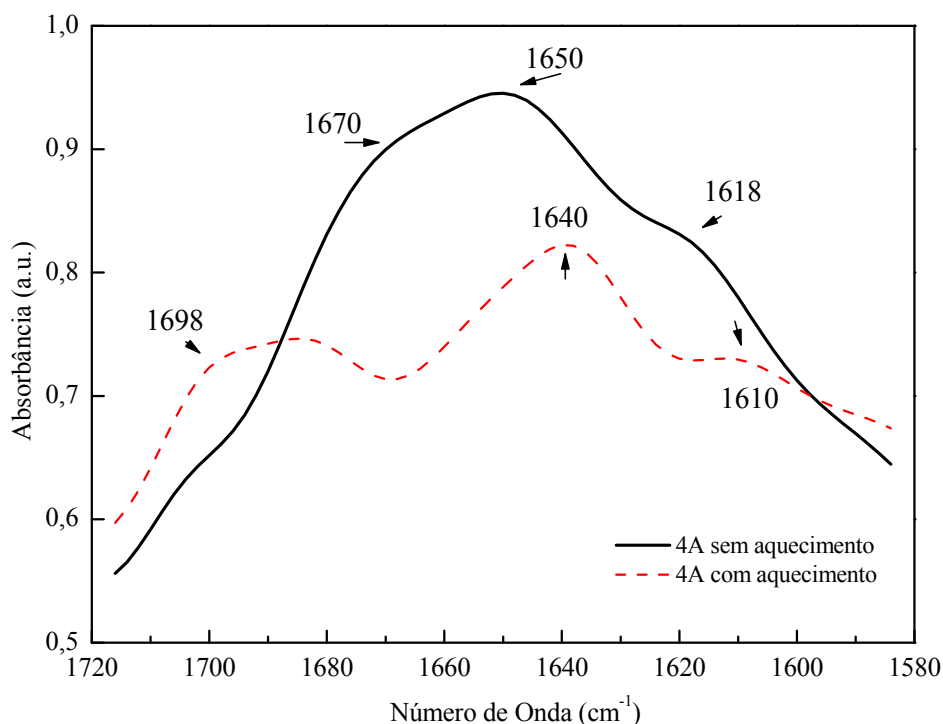


Figura 6.7 – Sobreposição dos espectros de infravermelho para os filmes de gliadina/glicerol (15 % m/m de gliadina), não aquecidos e aquecidos a 55 °C.

A adição do agente de reticulação [EDC/NHS] aos filmes de gliadina com diferentes concentrações de glicerol pode ser visualizado na Figura 6.8. Conforme comentado anteriormente (Capítulo 5), o processo de reticulação via carbodiimida foi confirmado pela quantificação dos grupos  $\epsilon$ -amino disponíveis na estrutura da gliadina. No entanto, as análises espectroscópicas puderam somente demonstrar deslocamentos relativos às bandas amida I e II (Figura 6.9) sem o aparecimento de novas bandas que sugerissem a formação de compostos intermediários resultantes do processo de reticulação. Este comportamento pode ser um indicativo de que os compostos intermediários como *o*-acilisouréia resultantes da reação entre os grupos carboxílicos da proteína e [EDC/NHS] foram, em grande parte, convertidos nas reações de reticulação o que resultaria nos deslocamentos característicos nas bandas de amida I e II.

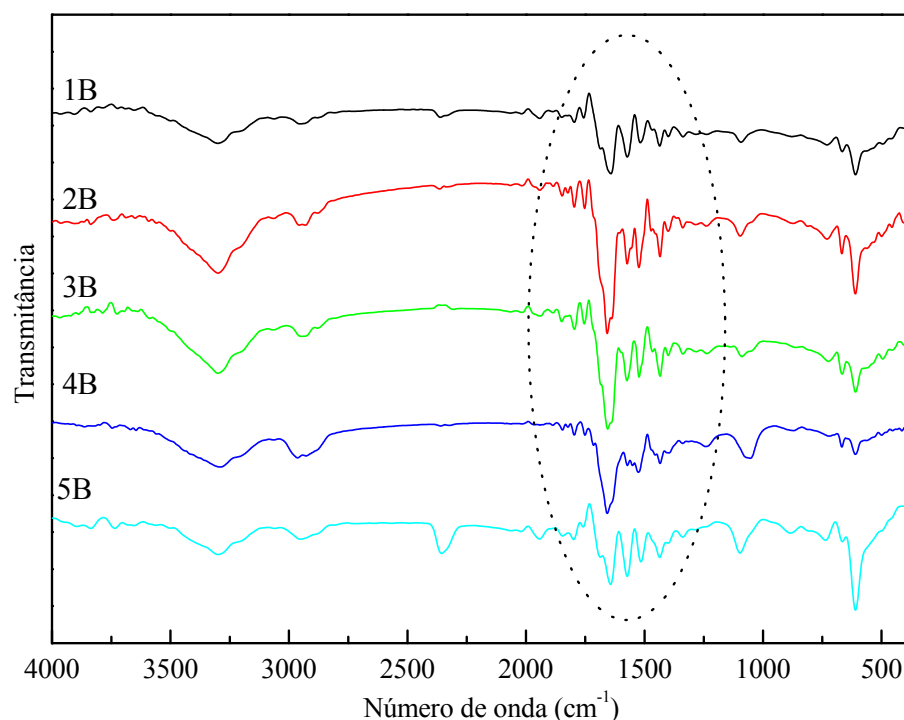


Figura 6.8 – Espectro na região do infravermelho para os filmes de gliadina reticulados com [EDC/NHS] (3,0 % m/m de gliadina) a diferentes concentrações de glicerol: 1B (zero); 2B (5 % m/m); 3B (10 % m/m); 4B (15 % m/m) e 5B (20 % m/m).

O efeito da adição de glicerol aos filmes reticulados mostrou um efeito similar ao ocorrido nos filmes não reticulados, ou seja, o plastificante promoveu deslocamentos na região de amida I com alguns poucos deslocamentos na região de amida II. As maiores diferenças nos espectros nas regiões de absorção de amida I foram os deslocamentos para números de onda maiores, com o aumento da concentração de glicerol. Estes deslocamentos provavelmente estão refletindo as contribuições de estruturas mais desordenadas, cadeias aleatórias, bem como confôrmeros  $\beta$  e suas mudanças de conformação no sentido do alcance de maior estabilidade. No entanto, alguns autores também atribuem estas mudanças a diferenças na conformação de estruturas  $\alpha$ -hélice.<sup>97</sup> Com o aumento da concentração de plastificante, a região de absorção da banda retorna ao patamar inicial semelhante àquele na ausência de plastificante, no entanto, revela o aparecimento de um ombro em  $1688\text{ cm}^{-1}$ . A presença desta absorção foi anteriormente observada por outros autores, no entanto, a atribuição desta banda na região espectral parece gerar algumas controvérsias, variando as denominações devido à presença de folhas  $\beta$  e/ou fitas  $\beta$ .<sup>98,99</sup>

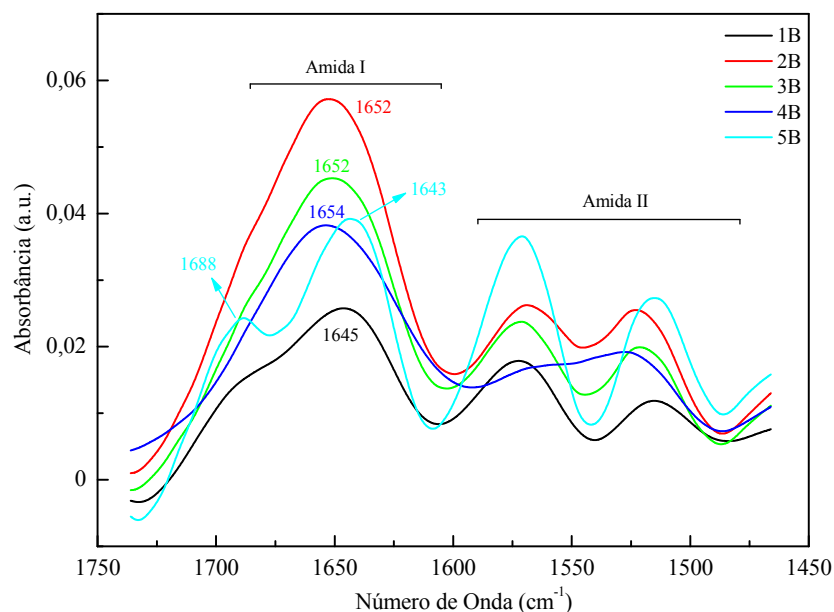


Figura 6.9 – Sobreposição dos espectros na região do infravermelho (1750 a 1450  $\text{cm}^{-1}$ ) para os filmes de gliadina reticulados com [EDC/NHS] (3,0 % m/m de gliadina) a diferentes concentrações de glicerol: 1B (zero); 2B (5 % m/m); 3B (10 % m/m); 4B (15 % m/m) e 5B (20 % m/m).

A região de amida II, representada pelas deformações angulares de N-H, mostra-se sensível a adição de plastificante, refletindo provavelmente o aumento das ligações de hidrogênio entre a cadeia lateral da proteína e o plastificante. Outra mudança observada nos espectros refere-se à razão entre os picos nas regiões de amida I e II. Com o aumento de plastificante, nota-se que suas razões crescem invariavelmente atingindo valores máximos a 15 % de glicerol; porém, decresce novamente a 20 % de glicerol. Estas mudanças podem estar refletindo as diferenças na distribuição das conformações de gliadina com o aumento de plastificante.

A analogia representativa para os filmes de gliadina nativos e reticulados com [EDC/NHS], em presença e ausência de glicerol pode ser observada na Figura 6.10. Tanto na ausência quanto na presença de plastificante foram observados deslocamentos característicos na região espectral referentes as amida I e II. Porém, nos filmes reticulados em presença de glicerol, a intensidade das bandas bem como a razão entre os picos foram maiores, o que corrobora com os resultados observados em experimentos anteriores (capítulos 4 e 5), cuja presença de glicerol parece ter contribuído para o aumento da velocidade na reação de reticulação e para a manutenção do enovelamento da proteína (Análise de Kratky, capítulo 4).

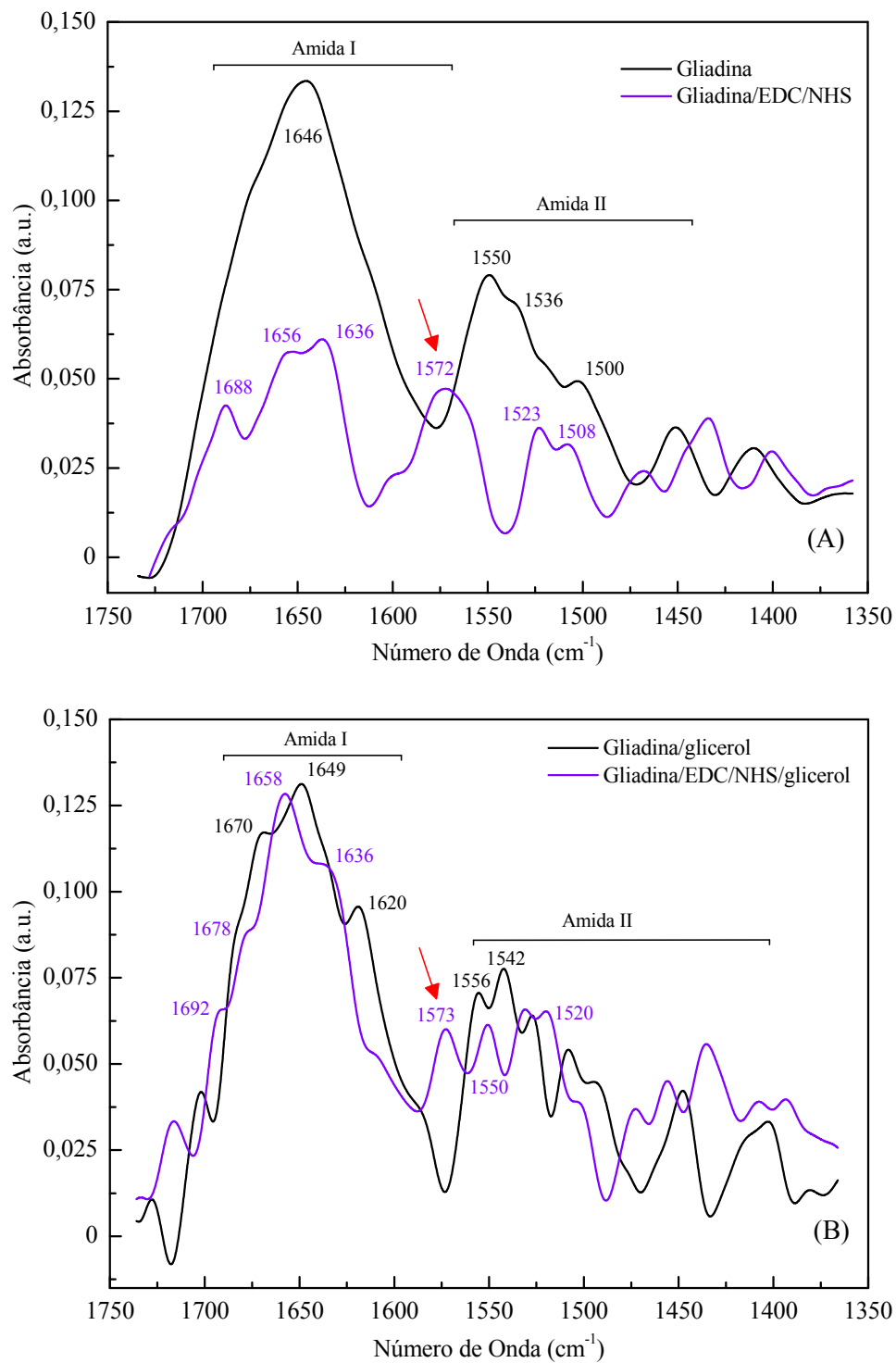


Figura 6.10 – Sobreposição dos espectros na região do infravermelho (1750 a 1350  $\text{cm}^{-1}$ ) para (A) filmes de gliadina nativa e reticulados com [EDC/NHS] (3,0 % m/m de gliadina) e; (B) filmes de gliadina nativos e reticulados com [EDC/NHS] (3,0 % m/m de gliadina) e na presença de glicerol (15 % m/m de gliadina).

Outro aspecto relevante na análise espectral é o surgimento de um pico de absorção, inexistente nos filmes não reticulados, em  $1572\text{ cm}^{-1}$  (Figura 6.10A) e  $1573\text{ cm}^{-1}$  (Figura 6.10B). Este pico pode estar confirmando a presença de cadeias distribuídas aleatoriamente (*random coiled*), mais estendidas e num grau maior de desordem em consequência da reação química entre a gliadina e [EDC/NHS].

Embora a variação no conteúdo de [EDC/NHS] no processo de reticulação da proteína também tenha sido avaliada por infravermelho (Figura 6.11), as informações mais relevantes foram somente observadas na razão entre os picos amida I e II e a intensidade das bandas nestas regiões. Comparando-se as concentrações empregadas nota-se que a 1,5 e 6,0 % de [EDC/NHS] a intensidade dos picos nas regiões de amida I e II são semelhantes, no entanto, a razão entre as regiões I e II a 6,0 % de reticulante parece ser levemente reduzida.

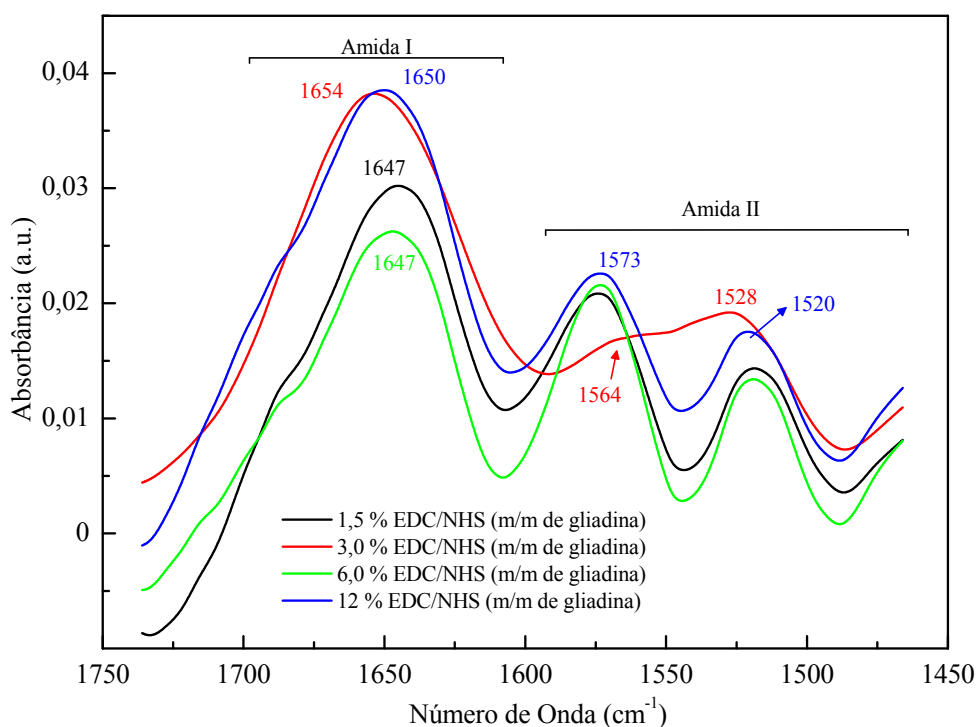


Figura 6.11 – Sobreposição dos espectros na região do infravermelho ( $1750$  a  $1450\text{ cm}^{-1}$ ) para filmes de gliadina reticulados com diferentes concentrações de [EDC/NHS] e com glicerol (15 % m/m de gliadina).

Curiosamente, a 3,0 % e a 12 % de reticulante ocorreram semelhanças nos deslocamentos de absorção e suas respectivas intensidades, somente na região de absorção de amida I. Os picos observados na região de amida II foram invertidos em função das diferentes



concentrações de reticulante.

O próximo sistema a ser analisado (Sistema C) é composto por gliadina/L-cisteína a diferentes concentrações de glicerol e o resultado das análises espectroscópicas na região do infravermelho pode ser visualizado nas Figuras 6.12 e 6.13. Essencialmente são observadas duas regiões de absorção distintas, a primeira delas situada em números de onda entre 3500 e 3000  $\text{cm}^{-1}$  e a segunda, em números de onda menores e, de forma semelhante aos sistemas A e B, característica da região das amidas I e II.

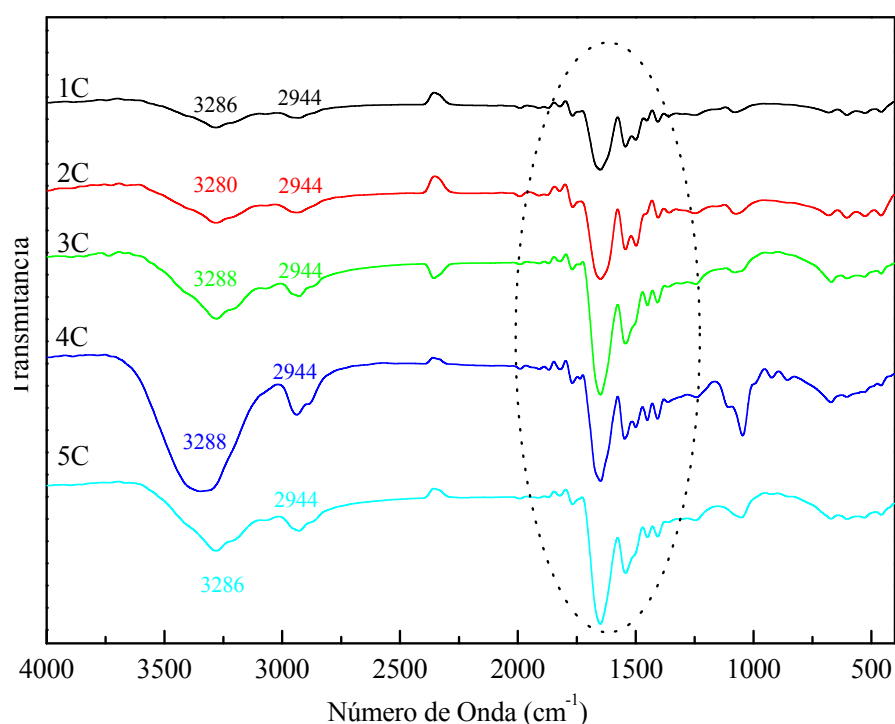


Figura 6.12 – Espectro na região do infravermelho para os filmes de gliadina reticulados com L-cisteína (1,5 % m/m de gliadina) e a diferentes concentrações de glicerol: 1C (zero); 2C (5 % m/m); 3C (10 % m/m); 4C (15 % m/m) e 5C (20 % m/m).

Na região espectral de 3700 – 3000  $\text{cm}^{-1}$  a gliadina apresenta uma banda característica de estiramentos O-H e N-H livres que é ampliada à medida que aumenta o conteúdo de glicerol nos filmes, o que revela o concomitante aumento destes grupos no sistema C. Ao segundo pico encontrado nesta região e adjacente ao pico anterior (2800 – 3200  $\text{cm}^{-1}$ ) é atribuído o estiramento C-H.

A segunda região observada e atribuída às amidas I e II pode ser visualizada com maiores detalhes através da sobreposição dos espectros na Figura 6.13. Na região de amida I o

aparecimento de um ombro em  $1620\text{ cm}^{-1}$  a concentrações menores de plastificante pode indicar a presença de estruturas mais estendidas que mudam sua conformação em função da crescente concentração de glicerol nos filmes. Outro ombro também é observado em  $1669$  e  $1672\text{ cm}^{-1}$  na ausência e a  $5\%$  de plastificante, respectivamente.

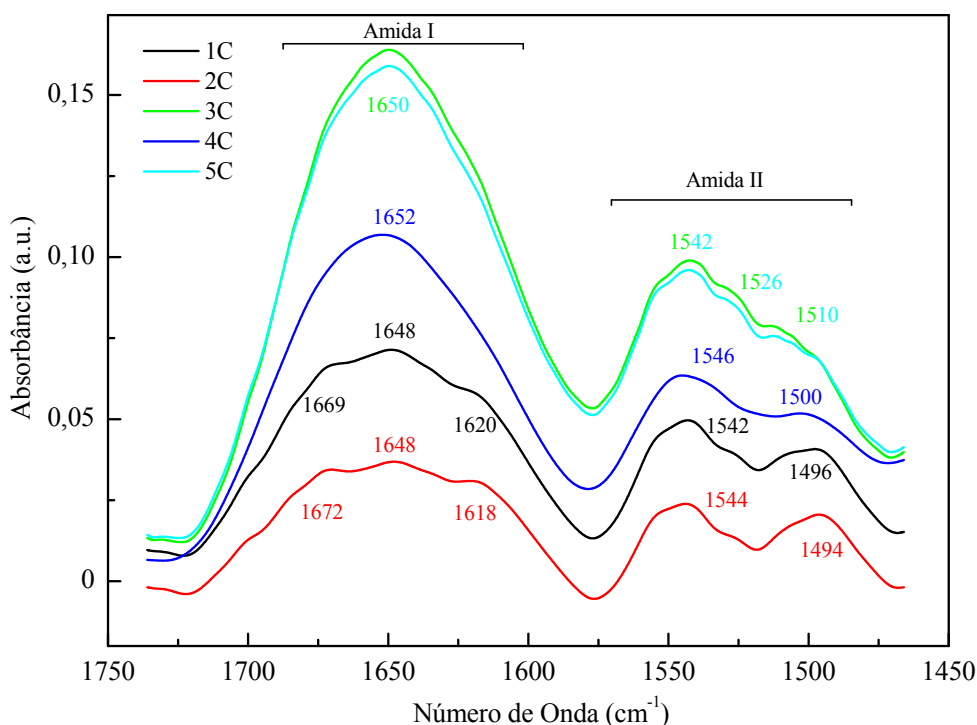


Figura 6.13 - Sobreposição dos espectros na região do infravermelho ( $1750 - 1450\text{ cm}^{-1}$ ) para os filmes de gliadina reticulados com L-cisteína ( $1,5\%$  m/m de gliadina) e a diferentes concentrações de glicerol: 1C (zero); 2C ( $5\%$  m/m); 3C ( $10\%$  m/m); 4C ( $15\%$  m/m) e 5C ( $20\%$  m/m).

Esta região possivelmente indica a presença de  $\beta$ -turns e mostra que o aumento de glicerol nos filmes induz a mudanças conformacionais ocasionadas pelas diferenças no volume livre entre as cadeias, ou seja, o aumento de glicerol e o conseqüente afastamento entre as cadeias, pode estar impossibilitando interações intermoleculares necessárias para o aparecimento destes picos em  $1620$  e  $1669\text{-}1672\text{ cm}^{-1}$ . Simultaneamente, também pode estar levando ao aumento na intensidade dos picos de absorção em  $1648\text{ cm}^{-1}$ , os quais se referem à presença de  $\alpha$ -hélice e conformações desordenadas resultantes dos processos de reticulação por L-cisteína.

Na região de amida II foram observadas mudanças na razão entre os picos as quais não corresponderam à proporção de glicerol adicionado; e conforme visualizado na Figura 6.13, a

10 e 20 % de glicerol, a intensidade e razão entre os picos foi bastante semelhante não se equiparando aos valores encontrados na ausência e na presença de 5, 15 e 20 % de glicerol.

É interessante notar que a redução abrupta nas intensidades das bandas de amida I e II, ocorre exatamente a 15 % de plastificante. Uma hipótese para este comportamento pode ser explicada pela interação entre a molécula de glicerol e proteína. Em concentrações até 10 % de glicerol, as moléculas de glicerol podem estar se difundindo ao longo da rede protéica de maneira similar as moléculas de água, assemelhando-se a água estrutural. Desta forma, ocorre o aumento da mobilidade das cadeias resultante do processo de solvatação das moléculas e acontecem simultaneamente interações proteína-proteína e proteína-glicerol. Em decorrência desta mobilidade, o máximo de interações inter e intramoleculares podem estar ocorrendo o que contribui para o aumento no tamanho do aglomerado protéico.

No entanto, a 15 % de plastificante, as interações proteína-glicerol e proteína-proteína parecem se nivelar e restringir o movimento das cadeias o que contribui para a queda na intensidade dos picos espectrais de absorção de amida I e II. O afastamento das cadeias é promovido de tal forma que se torna difícil o alcance de interações moleculares significativas.

Ao contrário do processo de reticulação promovido no sistema B, a reação entre a gliadina e L-cisteína parece não resultar em novos picos de absorção na região espectral. Ainda assim, ocorrem mudanças nas intensidades dos picos causados pelas diferenças de conformações estruturais, estas constatações são, em sua maioria, ressaltadas pelas bandas de absorção na região das amidas I e II (Figura 6.14). Todavia, a intensidade relativa dos picos para os filmes reticulados parece ter sido sempre inferior àquela observada para os filmes não reticulados até concentrações de glicerol inferiores a 15 %, quando então a intensidade das bandas para o filme reticulado sobrepõe-se àquela dos filmes não tratados com L-cisteína. Em concentrações de glicerol superiores, a diferença entre as intensidades cai novamente, no entanto, com uma discreta sobreposição de intensidade para o filme reticulado.

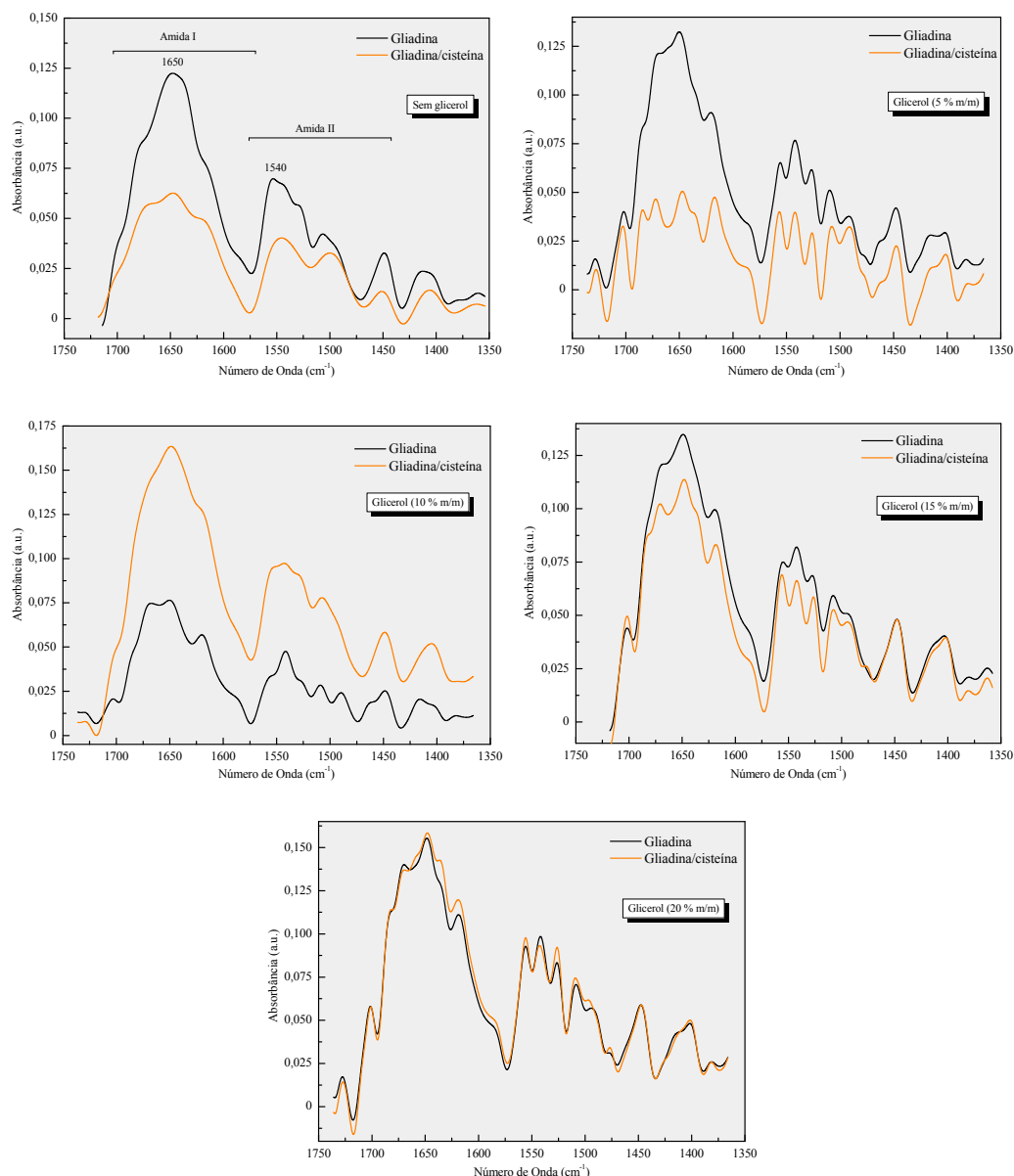


Figura 6.14 – Sobreposição dos espectros na região do infravermelho ( $1750$  a  $1350\text{ cm}^{-1}$ ) para os filmes de gliadina não reticulados e reticulados com L-cisteína ( $1,5\text{ \% m/m}$  de gliadina) na presença de diferentes concentrações de glicerol. A concentração de plastificante nos filmes encontra-se designada em cada espectro.

Constata-se, contudo que a razão nas intensidades entre as bandas em  $1750$  e  $1540\text{ cm}^{-1}$ , situadas nas regiões de amidas I e II, respectivamente, sofreram mudanças em função da presença de glicerol e sua concentração. Este comportamento colabora com a hipótese de equilíbrio de interações proteína-proteína e proteína-glicerol, nesta faixa de concentração. Além disso, a presença de L-cisteína parece não interferir para que este comportamento anômalo ocorra, já que a razão entre as bandas de absorção nas regiões de amida I e II ( $1650$  e

1540  $\text{cm}^{-1}$ , respectivamente) mudam de forma significativa e independente da presença de L-cisteína nos filmes. No entanto estas mudanças, refletidas pela forma das curvas na Figura 6.15, parecem ocorrer de forma distinta.

A Figura 6.15 mostra a razão das intensidades das bandas amida I e II para os filmes não reticulados e reticulados com L-cisteína, em função da concentração de glicerol. A banda em 1750  $\text{cm}^{-1}$  reflete a presença de conformações desordenadas, contribuições de estruturas  $\alpha$ -hélice e confôrmeros  $\beta$ , enquanto a segunda banda em 1540  $\text{cm}^{-1}$  é resultante da interação entre a deformação angular N-H e o estiramento C-N do grupo C-N-H e pode estar representando cadeias mais estendidas.

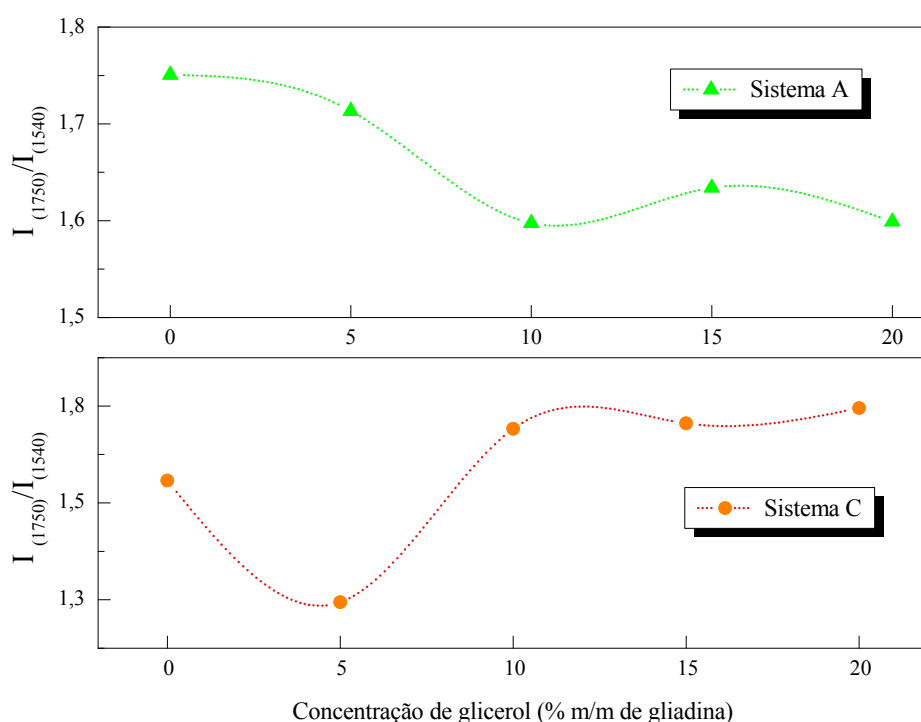


Figura 6.15 – Razão das intensidades na região das amidas I e II (1750 e 1540  $\text{cm}^{-1}$ , respectivamente) para os filmes não reticulados (Sistema A) e reticulados com L-cisteína (1,5 % m/m de gliadina) (Sistema C) em função da concentração de glicerol.

Nota-se que apesar da inerente mudança de conformação da proteína, na presença de L-cisteína e 10 % de glicerol o sistema atinge certa estabilidade que contribui paralelamente para o aumento na intensidade das bandas e também para diferenças nos picos de absorção de amida I e II. Deduz-se que o espaçamento entre as cadeias, distribuídas aleatoriamente, esteja cooperando para a formação de agregados mais estáveis nos filmes reticulados. No entanto,

supõe-se que oscilações expressivas no tamanho e movimento destes agregados serão somente percebidas a concentrações superiores de glicerol.

Já o sistema não reticulado, contrapondo-se ao comportamento anterior, apresentou menor intensidade nos picos de absorção de amida I e II. Este fato pode estar demonstrando que as contribuições para a estabilidade nas estruturas  $\alpha$ -hélice e nos confôrmeros  $\beta$  podem estar impedidos pela presença do glicerol, restando menor possibilidade no equilíbrio entre a interação destas estruturas e compostos resultantes dos picos de absorção de amida II. Com base neste comportamento, a adição de L-cisteína vem colaborar para que ocorram mudanças conformacionais capazes de aumentar a estabilidade do sistema.

#### *6.4 Conclusões Parciais*

Os estudos de estabilidade térmica realizados possibilitaram avaliar o papel do glicerol e dos diferentes reticulantes na degradação dos filmes de gliadina. Conforme esperado, a presença de glicerol nos filmes de gliadina não reticulado reduziu a  $T_g$  proporcionalmente a quantidade de plastificante empregada. Estas mudanças foram observadas em igual tendência para o sistema reticulado com [EDC/NHS], no entanto, toda a faixa de temperatura manteve-se acima das observadas para os filmes não reticulados.

O sistema composto por gliadina e L-cisteína, apresentou as maiores temperaturas de transição vítrea demonstrando que a L-cisteína foi capaz de promover a formação de agregados mais resistentes à ação da temperatura. No entanto, ao contrário do observado para os sistemas A e B, as variações na  $T_g$  não se deram proporcionalmente a concentração de glicerol. O emprego de 10 % de plastificante parece ter colaborado para um equilíbrio de interações que levaram a uma conformação mais estável e um maior grau de empacotamento das cadeias.

A adição de glicerol promoveu a desestabilização na temperatura de degradação térmica dos filmes e a quantidade de massa residual diminuiu com o aumento de plastificante. No sistema A, a redução na temperatura ocorreu de maneira gradual, enquanto que para o sistema B foi menos pronunciada e para o sistema C observou-se uma significativa desestabilização térmica para concentrações elevadas de plastificante.

Acredita-se que este comportamento esteja relacionado com o volume livre das macromoléculas de gliadina, ou seja, ao elevar-se a concentração de glicerol há um favorecimento das interações proteína-plastificante em detrimento das interações proteína-

proteína. Ante este fato, os segmentos das cadeias de gliadina movimentam-se com maior liberdade durante o aquecimento, provocando maiores polarizações das ligações peptídicas e consequentemente, uma redução na estabilidade térmica. Além disso, os segmentos de baixa massa molar formados durante a decomposição encontram maior espaço livre para se difundirem ao longo do material até passarem à fase gasosa, o que provoca uma perda de massa em temperaturas menores.

As análises espectroscópicas puderam auxiliar de maneira bastante conclusiva nas observações levantadas pelos estudos de estabilidade térmica. O sistema não reticulado estudado em função do tratamento térmico a 55 °C mostrou de maneira geral bandas nas regiões de número de onda situado entre 2800-3600  $\text{cm}^{-1}$ . Estas bandas foram atribuídas às vibrações de estiramento de O-H e N-H livres, enquanto que uma pequena banda em 2800-3000  $\text{cm}^{-1}$  foi atribuída ao estiramento C-H. Os filmes não reticulados também apresentaram em 1072  $\text{cm}^{-1}$  uma banda característica de estiramento C-N de aminas; além de mostrarem bandas de absorção mais específicas na região de amida I (1650  $\text{cm}^{-1}$ ), relacionadas à vibração do estiramento C=O e C-N e; amida II, referente à deformação angular N-H (1540 e 1560  $\text{cm}^{-1}$ ) e estiramento C-N. O processo de avaliação das bandas de amida I e II mostrou-se fundamental para elucidar diferenças ocorridas em função do aquecimento das suspensões, antes das mesmas serem submetidas à evaporação.

O efeito da adição de glicerol aos filmes reticulados por [EDC/NHS] mostrou um efeito similar ao ocorrido nos filmes não reticulados. As maiores diferenças nos espectros nas regiões de absorção de amida I foram os deslocamentos para números de onda maiores, com o aumento da concentração de glicerol. Estes deslocamentos podem estar refletindo contribuições de estruturas mais desordenadas, cadeias aleatórias, bem como confôrmeros  $\beta$  e suas mudanças de conformação no sentido do alcance de maior estabilidade.

Ao contrário do processo de reticulação promovido no sistema B, a reação entre a gliadina e L-cisteína parece não resultar em novos picos de absorção na região espectral. A intensidade relativa dos picos mostrou-se sempre inferior àquela observada para os filmes não reticulados até concentrações de glicerol inferiores a 15 %, quando então a intensidade das bandas para o filme reticulado sobrepõe-se àquela dos filmes não tratados com L-cisteína. Em concentrações de glicerol superiores, a diferença entre as intensidades cai novamente, no entanto, com uma discreta sobreposição de intensidade para o filme reticulado. Parece que na presença de 10 % de glicerol o sistema atinge certa estabilidade contribuindo para o aumento na intensidade das bandas e também para diferenças nos picos de absorção de amida I e II.

### **PROPRIEDADES MECÂNICAS, INTUMESCIMENTO E SOLUBILIDADE, MORFOLOGIA E ISOTERMAS DE ADSORÇÃO DE FILMES COMPOSTOS POR GLIADINA, GLIADINA/[EDC/NHS] E GLIADINA/L-CISTEÍNA**

#### *7.1 Resumo*

Neste capítulo os filmes obtidos a partir das suspensões estudadas foram submetidos a ensaios mecânicos. Os filmes preparados a diferentes concentrações de glicerol foram armazenados a diferentes umidades relativas e parâmetros tais como: tensão máxima, deformação na ruptura e módulo elástico ou de Young foram analisados. Uma vez formados, os biofilmes a base de gliadina foram analisados quanto as suas propriedades de intumescimento e/ou solubilidade as quais podem sofrer influência da microestrutura resultante nos filmes nativos e reticulados. Por fim, com o intuito de se observar mais criteriosamente como a água foi absorvida pelos filmes, isotermas de adsorção de umidade foram obtidas e, mais além, parâmetros matemáticos de ajuste tais como Oswin e BET foram empregados para comparação e adaptação aos dados experimentais obtidos. Esta etapa do trabalho finaliza a pesquisa iniciada pelo estudo em suspensão no capítulo 4 e tem como objetivo entender a relação entre o resultado das técnicas empregadas nos filmes de gliadina nativos e reticulados.

#### *7.2 Procedimento Experimental*

##### *7.2.1 Material*

A descrição do material utilizado neste capítulo bem como o preparo das suspensões de proteína pode ser encontrada nos itens 4.2.1 e 4.2.2 do capítulo 4.

##### *7.2.2 Preparo dos Filmes*

O preparo dos filmes foi realizado conforme descrição detalhada no item 6.2.2 do capítulo 6. A interpretação dos resultados será realizada em alguns momentos conforme as denominações empregadas anteriormente e descritas na Tabela 5.1 (Capítulo 5).



### 7.2.3 Ensaios Mecânicos

Os ensaios mecânicos foram realizados em uma máquina de ensaio universal (EMIC-DL-500), de acordo com as normas ASTM D882-95a (*Standard Test Method for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting*) que compreende a determinação de propriedades de tensão ou tração de plásticos na forma de folhas delgadas, incluindo filmes (com menos de 1,0 mm de espessura).

Para os filmes de gliadina nativos e reticulados com dimensões de 100 mm de comprimento por 25 mm de largura foram coletados dados como: tensão máxima, tensão de ruptura, alongação na ruptura e módulo de elasticidade (módulo de Young) (Figura 7.1). As amostras recortadas (12 corpos de prova) foram armazenadas em estufa à vácuo por 24 horas, antes de serem acondicionadas em diferentes umidades relativas (UR) (23, 46 e 77,3 %) por 15 dias antes da execução das análises. A separação inicial das garras no equipamento foi de 50 mm e a velocidade de tração para os ensaios foi de  $20 \text{ mm min}^{-1}$ , com célula de carga de 50 kgf.

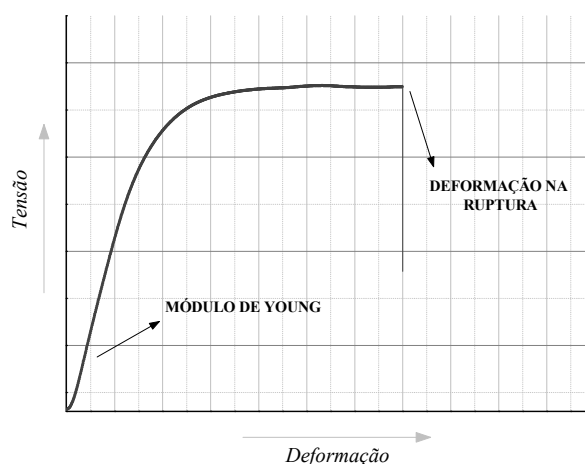


Figura 7.1 – Curva de tensão versus deformação generalizada

### 7.2.4 Grau de intumescimento (GI) e solubilidade em água (SI)

A análise do grau de intumescimento e solubilidade em água foram realizadas nos filmes formados a partir de suspensões de gliadina nativa e reticulada com [EDC/NHS] e L-cisteína, na presença de diferentes concentrações de glicerol. Foram preparadas amostras nas dimensões 2 cm x 2 cm, as quais foram previamente secas em estufa a vácuo por 24 horas. Posteriormente, as amostras foram imersas em um béquer com 50 mL de água destilada a

temperatura ambiente por 24 horas sob agitação ocasional. Decorrido este período, os filmes intumescidos são removidos e submetidos a uma leve secagem da superfície com papel absorvente para retirar o excesso de água e pesados. A amostra de filme remanescente é seca novamente até obtenção de peso constante. O grau de intumescimento e a solubilidade em água foram calculados de acordo com as equações 7.1 e 7.2. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

$$\%S = \frac{m_i - m_f}{m_i} \times 100 \quad (7.1)$$

Onde:

$m_i$  = massa inicial seca

$m_f$  = massa final após obtenção de peso constante

$$\%GI = \frac{m_i - m_{fi}}{m_i} \times 100 \quad (7.2)$$

Onde:

$m_i$  = massa inicial seca

$m_{fi}$  = massa final intumescida após 24 horas de imersão em água

#### 7.2.5 Absorção de água

Para os ensaios de absorção de água filmes nas dimensões de 3 cm x 3 cm foram submetidos a um ambiente de umidade relativa de 23, 46 e 77,3 % obtidos com soluções saturadas de acetato de potássio ( $\text{CH}_3\text{COOK}$ ), carbonato de potássio ( $\text{K}_2\text{CO}_3$ ) e cloreto de amônio ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ), respectivamente. As amostras (em triplicata) foram previamente secas em estufa à vácuo até obtenção de peso constante e acondicionadas em sistema vedado nas umidades desejadas. Em períodos de tempos pré-determinados, as amostras foram pesadas e o conteúdo de água adsorvida em porcentagem foi determinado. O cálculo foi realizado considerando-se a massa da amostra submetida à umidade no tempo  $t$  ( $m_t$ ) e a massa da amostra seca ( $m_0$ ) de acordo com a equação 7.3.

$$\text{Absorção de água (\%)} = \frac{m_t - m_0}{m_0} \times 100 \quad (7.3)$$

### *7.2.6 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)*

Na microscopia eletrônica de varredura, os elétrons provenientes da fonte se chocam com a amostra, são refletidos e detectados, formando assim a imagem topográfica da superfície do espécime observado. Esta análise foi realizada a fim de se avaliar a influência do processo de reticulação e a variação estequiométrica dos reticulantes e plastificante na morfologia dos filmes. Foram avaliadas amostras da superfície (parte superior do filme sem contato com a placa de secagem) e da secção transversal (criogenicamente fraturadas por imersão em nitrogênio líquido) dos filmes. As amostras foram fixadas em um suporte metálico e recobertas com uma fina camada de ouro utilizando o metalizador diode sputtering. Os filmes foram observados em um microscópio Phillips XL-30.

## *7.3 Resultados e Discussão*

### *7.3.1 Ensaios Mecânicos*

A realização de testes mecânicos em filmes formados a partir de suspensões de gliadina permite que seja avaliado o papel do glicerol, a variação de sua concentração e também o papel dos diferentes agentes de reticulação nas propriedades dos filmes formados. Com isto, têm-se a coleta de três variáveis importantes: tensão máxima (MPa), deformação na ruptura (%) e o módulo de elasticidade ou módulo de Young (MPa). Baseando-se nestas condições e resultados, ter-se-á um material com propriedades mecânicas específicas para determinada aplicação.

Os resultados de tensão máxima para os filmes compostos apenas por gliadina, gliadina/[EDC/NHS] e gliadina/L-cisteína, podem ser visualizados na Figura 7.2. Nesta mesma figura, o comportamento dos sistemas pode ser observado a diferentes umidades relativas (23, 46 e 77,3 %) e em função da concentração de glicerol nos filmes.

Os valores de tensão máxima a 23 % de UR (Figura 7.2A) para os filmes de gliadina não reticulados decaíram linearmente de  $7,8 \pm 1,5$  para  $1,9 \pm 0,3$  MPa, com o aumento de glicerol nos filmes. Este comportamento já era esperado pelo fato do plastificante reduzir as interações intermoleculares e por sua presença aumentar concomitantemente as ligações de hidrogênio. A formação de ligações de hidrogênio na estrutura da proteína pode provocar novos tipos de interações que contribuem para o aumento de flexibilidade e, por consequência, reduzem a tensão máxima nos filmes.

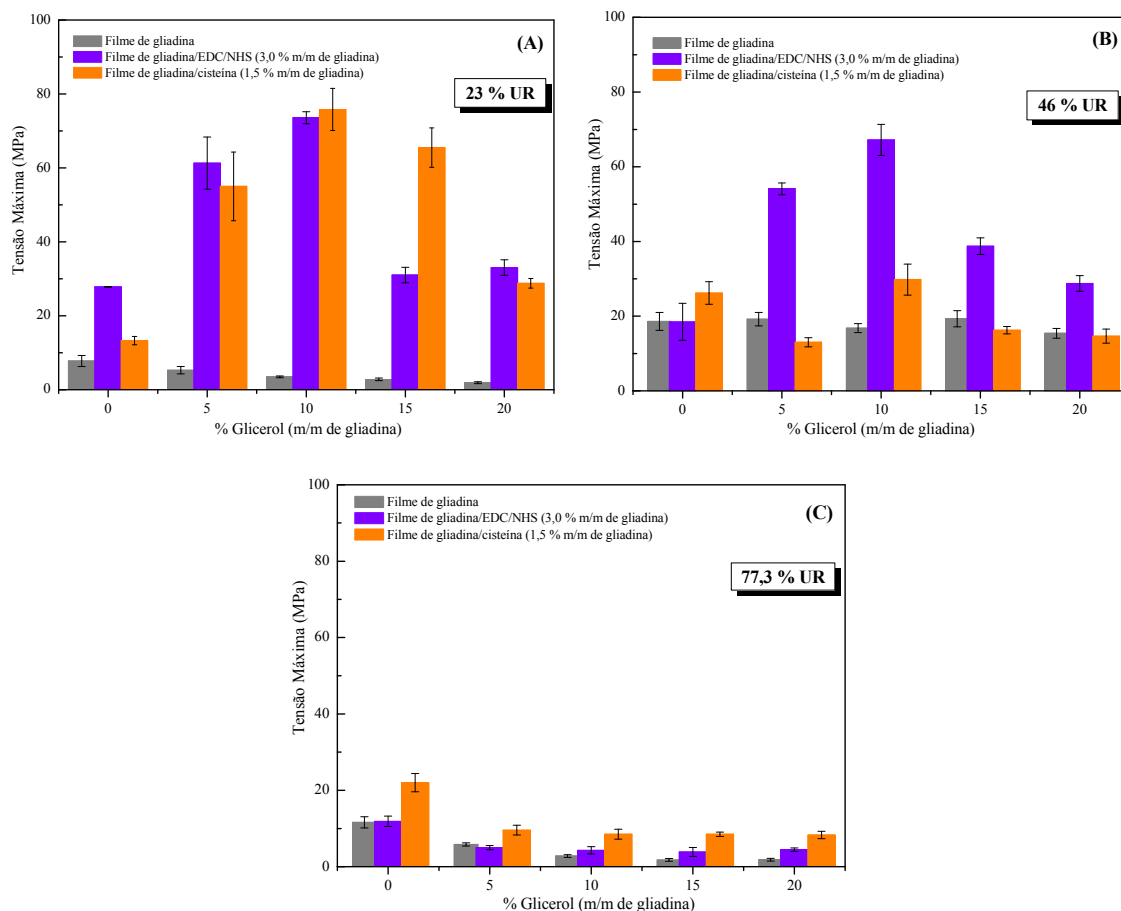


Figura 7.2 – Valores de tensão máxima observados para os filmes de gliadina não reticulados, filmes de gliadina/[EDC/NHS] e gliadina/L-cisteína, em função da concentração de glicerol adicionado, e a diferentes umidades relativas (%): (A) 23, (B) 46, (C) 77,3.

Os filmes reticulados com [EDC/NHS] apresentaram valores de tensão máxima significativamente superiores aos filmes não reticulados. No entanto, o aumento linear nos valores de tensão foi observado somente até 10 % de glicerol, quando passaram a decair, atingindo aproximadamente  $33,0 \pm 2,1$  MPa à 20 % de glicerol.

Um padrão de comportamento similar foi detectado para os filmes de gliadina/L-cisteína. Porém, a partir da concentração 10 % de glicerol, apesar da queda característica nos valores de tensão, também observada para o sistema gliadina/[EDC/NHS], os valores de tensão para o sistema contendo L-cisteína tornaram-se superiores aos do sistema com adição de [EDC/NHS] e se mantiveram nesta condição até 15 % de glicerol, quando então a tensão máxima do sistema gliadina/[EDC/NHS] e gliadina/L-cisteína com 20% de glicerol foram próximas ( $33,0 \pm 2,1$  e  $28,8 \pm 1,3$ , respectivamente).

Os valores baixos de umidade relativa (23 %) e concentrações elevadas de glicerol (até

15 %) parecem favorecer o sistema gliadina/*L*-cisteína no sentido de uma maior tensão máxima. Todavia, os valores de tensão máxima aumentados tanto nos filmes adicionados de [EDC/NHS] quanto de *L*-cisteína, mostram a efetividade do processo de reticulação. Embora atuem por mecanismos diferentes, ambos foram capazes de aumentar a resistência dos filmes, ainda que perante diferentes concentrações de glicerol, cujo efeito pode ser sentido principalmente pela redução na tensão máxima.

O aumento da resistência em filmes reticulados já fora relatado na literatura,<sup>62</sup> no entanto, cabe ressaltar que este aumento parece estar sempre relacionado ao mecanismo de reticulação entre os componentes e suas respectivas concentrações nos filmes.

A elevação da umidade relativa (Figura 7.2B) parece ter contribuído para o aumento na tensão máxima nos filmes nativos, porém, efeito contrário fora observado para os filmes reticulados. Este mesmo efeito contrário fora relatado na literatura para filmes a base de glúten.<sup>100</sup> No entanto, a 77,3 % (Figura 7.2C) de umidade relativa, todos os filmes; reticulados ou não, tiveram suas resistências reduzidas e a proporção desta redução mantivera-se relacionada à quantidade de plastificante adicionada aos filmes. Torna-se evidente que a água, assim como o glicerol, atua como plastificante e, a elevadas umidades relativas, ambos parecem ter atuado na redução da tensão máxima nos filmes. Efeito semelhante fora observado por Barreto (2003),<sup>101</sup> embora trabalhando com valores de umidade relativa diferentes, o que não limita (ou limitou) sobremaneira o efeito do plastificante em reduzir a tensão máxima nos filmes.

A deformação na ruptura para os filmes de gliadina nativa e reticulada pode ser observada na Figura 7.3. Como resultado da formação de uma estrutura mais rígida e, portanto, mais resistente espera-se que a deformação na ruptura seja reduzida nos filmes reticulados. De fato, este comportamento pôde ser assegurado no tocante à umidade relativa 23 % (Figura 7.3A), como resultado da redução da extensibilidade nos filmes reticulados por [EDC/NHS] e *L*-cisteína. Esta restrição de mobilidade das cadeias moleculares nos filmes e a conseqüente redução em sua deformação fora atrelada à concentração de glicerol adicionado, mas ainda assim, a deformação na ruptura para os filmes reticulados mostrara-se sempre inferior àquela observada para os filmes nativos.

No entanto, em umidades relativas maiores, a água parece ter exercido papel fundamental como plastificante, e juntamente com o glicerol pode ter contribuído para o aumento na mobilidade das cadeias. Ainda neste sentido, a 77,3 % a quantidade de água parece ter sido vital para os valores significativamente superiores de deformação observados

nos filmes reticulados com [EDC/NHS].

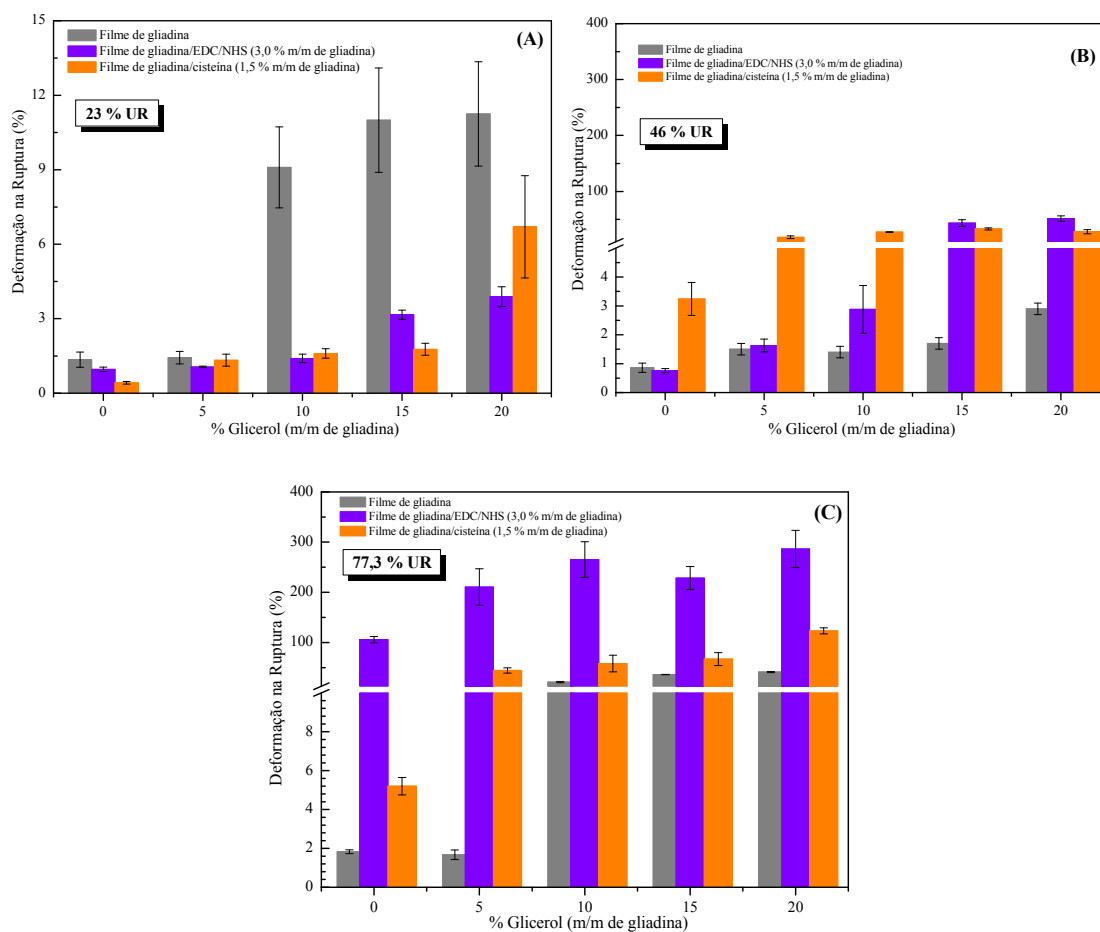


Figura 7.3 - Valores de deformação na ruptura observados para os filmes de gliadina não reticulados, filmes de gliadina/[EDC/NHS] e gliadina/L-cisteína, em função da concentração de glicerol adicionado, e a diferentes umidades relativas (%): (A) 23, (B) 46, (C) 77,3.

De maneira distinta do sistema gliadina/L-cisteína, a estrutura resultante dos filmes formados por gliadina/[EDC/NHS], perdem parte de sua estrutura globular frente à reação de reticulação (vide Capítulo 4). Como resultado deste processo, tem-se uma estrutura formada, em sua maioria, por cadeias distribuídas randomicamente, as quais podem ceder espaço para que moléculas de água difundam-se mais facilmente, o que levaria a maior mobilidade molecular e certamente, a elevação na extensibilidade do material.

Os valores de módulo para os filmes reticulados (Figura 7.4A) mostraram-se superiores ao valor de módulo para os filmes nativos quando em 23 % de umidade relativa e o decréscimo em seus valores parece ter sido proporcional ao aumento na concentração de glicerol, tanto para os filmes nativos, quanto reticulados. Curiosamente, a 46 % de umidade

relativa, o módulo observado para os filmes reticulados com [EDC/NHS] mantém-se superior ao valor de módulo para os filmes nativos, entretanto, os filmes reticulados com L-cisteína, sofrem uma queda em seus valores e com isto, tornam-se os menos rígidos dentre os filmes estudados. Já a 77,3 % de umidade relativa (Figura 7.4C), embora todos os filmes tenham apresentado uma queda abrupta em seus valores de módulo, os filmes reticulados com [EDC/NHS], são mais uma vez, os mais sensíveis à umidade e demonstram com isto serem os menos rígidos a umidades relativas elevadas.

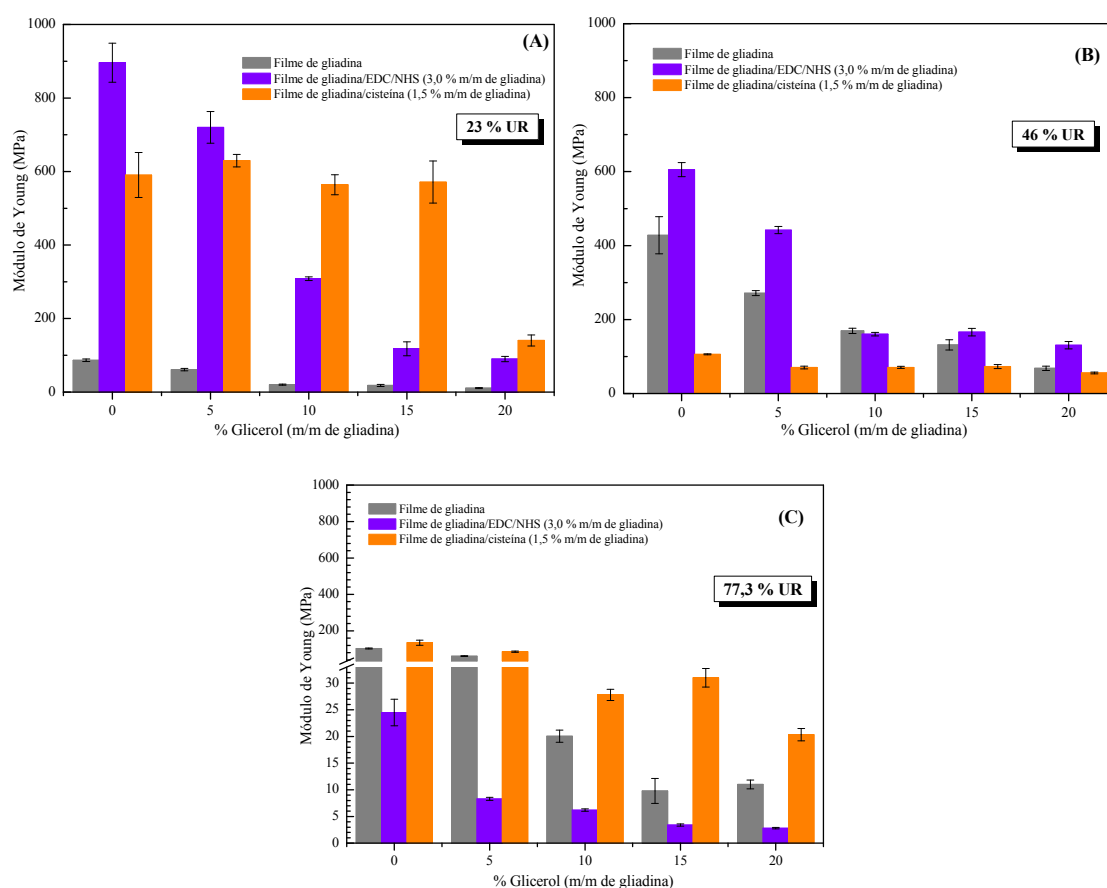


Figura 7.4 – Valores de módulo de Young observados para os filmes de gliadina não reticulados, filmes de gliadina/[EDC/NHS] e gliadina/L-cisteína, em função da concentração de glicerol adicionado, e a diferentes umidades relativas (%): (A) 23, (B) 46, (C) 77,3.

De maneira geral, os filmes reticulados tiveram suas propriedades mecânicas melhoradas e este efeito pôde ser observado principalmente a 23 % de umidade relativa. A variação de umidade provocou mudanças nos parâmetros mecânicos, mas ainda assim, o processo de reticulação parece ter resultado em mudanças significativas nos filmes, quando comparados aos filmes não reticulados.

### 7.3.2 Grau de Intumescimento (GI) e solubilidade em água (SI)

O grau de intumescimento e a solubilidade em água são propriedades que permitem avaliar o comportamento dos filmes frente à imersão em diferentes solventes. Dependendo da aplicação a que se destina, graus de solubilidade e/ou intumescimento são requeridos em maior ou menor grau e esta variação está intimamente relacionada ao teor de plastificante e aos agentes de reticulação empregados.<sup>102</sup>

No presente trabalho, a solubilidade e intumescimento dos filmes de gliadina nativos e modificados pela presença de *L*-cisteína e [EDC/NHS] a diferentes concentrações de glicerol, encontram-se detalhadas nas Figuras 7.5 e 7.6. Após 24 horas de imersão em água, a temperatura ambiente e sob eventual agitação, os filmes mantiveram sua integridade física, no entanto, foram observadas diferenças entre os filmes, quanto à presença ou não de agentes de reticulação e, ainda, pela variação da concentração de glicerol dos filmes.

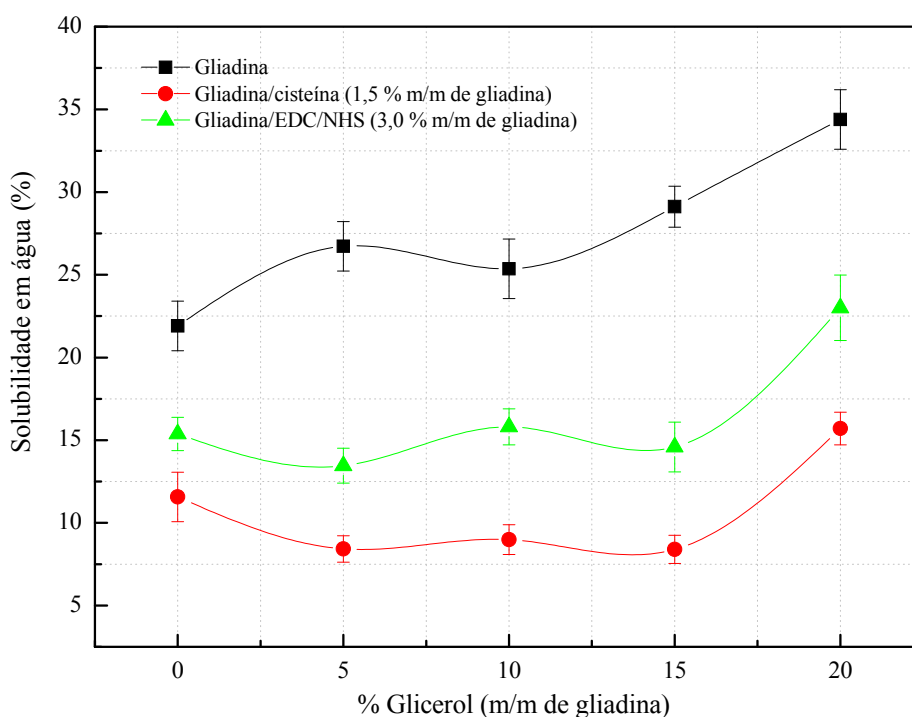


Figura 7.5 – Grau de solubilidade em água (%) para os filmes de gliadina nativos e reticulados em função de diferentes concentrações de plastificante.



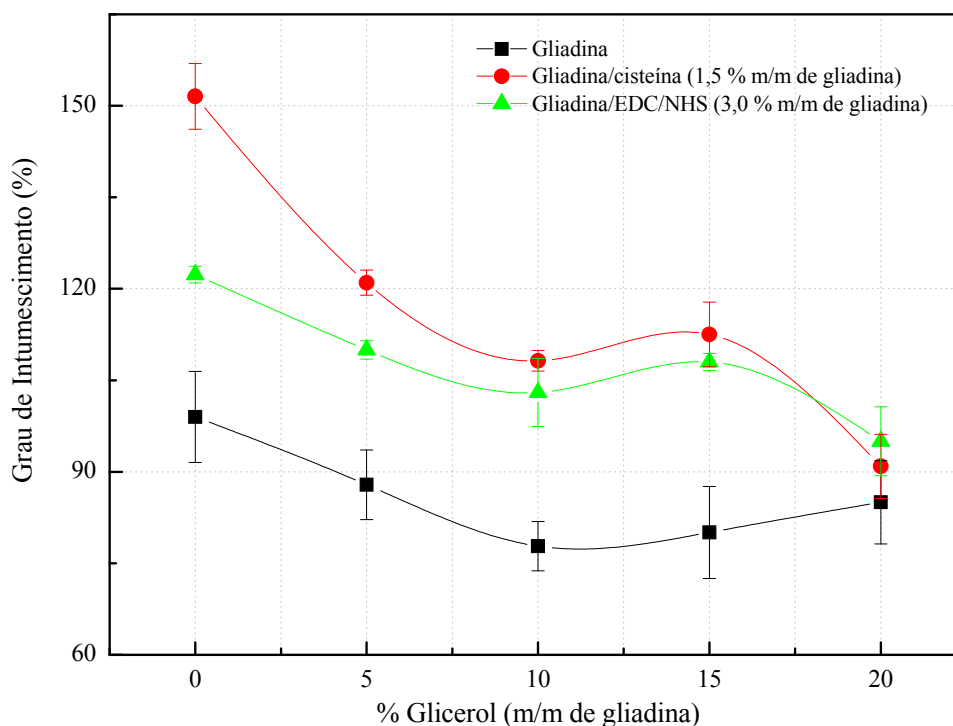


Figura 7.6 – Grau de intumescimento em água para os filmes de gliadina nativos e reticulados em função de diferentes concentrações de plastificante.

Os filmes de gliadina não reticulados foram os que apresentaram maior solubilidade ( $21,9 \pm 2,0$  a  $34,4 \pm 2,0$  %) e menor intumescimento ( $99 \pm 1,9$  a  $85 \pm 2,0$ ), para toda a faixa de concentração de glicerol empregada. Além disso, a solubilidade fora aumentada proporcionalmente com o aumento de plastificante nos filmes. Este mesmo comportamento fora observado para os filmes reticulados por [EDC/NHS] e L-cisteína, no entanto, enquanto a solubilidade dos primeiros encontrara-se situada entre ( $15,4 \pm 1,0$  a  $23 \pm 2,0$ ), o segundo mostrara-se o menos solúvel dentre os filmes analisados neste trabalho ( $11,6 \pm 1,5$  a  $15,7 \pm 1,8$ ). O aumento da solubilidade e conseqüente redução no intumescimento, em função da presença de glicerol também foram relatados em alguns trabalhos na literatura,<sup>25,62,103</sup> e em cada caso, as mudanças estão relacionadas à estrutura dos polímeros e/ou biopolímeros usados, o grau de dissolução e de ligações de hidrogênio presentes.

A menor solubilidade dos filmes de gliadina/L-cisteína quando comparada aos filmes não reticulados, parece estar associada à formação de uma rede de ligações mais coesa (pelo aumento da interação proteína-proteína) cuja formação de agregados resultante implica em menor espaço intermolecular entre as cadeias e, por conseguinte, dificuldade na difusão de água através do filme. Outra hipótese pode ser devido à menor interação entre proteína e

solvente que levaria ao aumento da hidrofobicidade na superfície do filme, levando a redução nos parâmetros de solubilidade.<sup>104,105</sup>

Os filmes de gliadina reticulados com [EDC/NHS], pelo fato de apresentarem além de certo grau de desenovelamento, já observado pelas análises de espalhamento de raios X a baixos ângulos (Capítulo 4), também dão origem a cadeias distribuídas aleatoriamente e com maior espaçamento intermolecular, doravante, a penetração e difusão de água tornam-se facilitada, porém em menor grau quando comparada a gliadina não reticulada.

No entanto, o fato dos três sistemas terem mantido sua integridade quando imersos em água pode ser explicado pelo prévio aquecimento das suspensões formadoras dos filmes, além das mudanças de pH propícias as reações de cada reticulante em particular, bem como as mudanças de pH para as suspensões sem adição de reticulante.

No caso das suspensões não reticuladas, a mudança de pH e o aquecimento são indícios de que rearranjos estruturais podem estar acontecendo e implicando em mudanças não somente na solubilização das proteínas em suspensão, como também nos filmes formados. Estas reações, se ocorridas ao longo do processo de evaporação e formação do filme podem resultar, sem dúvida, em diferentes parâmetros de solubilidade.

Outro fator relevante e que não pode ser descartado é o tempo utilizado para a solubilização de cada filme, embora todos tenham mantido sua integridade durante as primeiras 24 horas, a extensão desta integridade a tempos maiores não pode ser garantida baseada somente nestas primeiras 24 horas de análise.

### *7.3.3 Morfologia*

Os filmes obtidos a partir das suspensões de gliadina estão ilustrados nas Figuras de 7.7 a 7.9, onde são mostradas a superfície e secção transversal (fratura) dos sistemas compostos por gliadina não reticulada, gliadina/[EDC/NHS] e gliadina/L-cisteína; todos a diferentes concentrações de glicerol.

A micrografia do filme de gliadina não reticulado e sem plastificante (Figura 7.7) mostra uma superfície lisa, homogênea e sem a presença de poros. Comparativamente, a superfície dos filmes a 5 % e 10 % de glicerol não sofrem mudanças deixando-os com as mesmas características observadas para os filmes em ausência de plastificante. Já em presença de 15 % de glicerol, observa-se na superfície dos filmes, o surgimento de vários poros, além

de certo grau de rugosidade. Com o aumento do plastificante (20 %), a rugosidade aumentou enquanto que os poros parecem ser reduzidos quando comparados a concentração de plastificante empregada anteriormente.

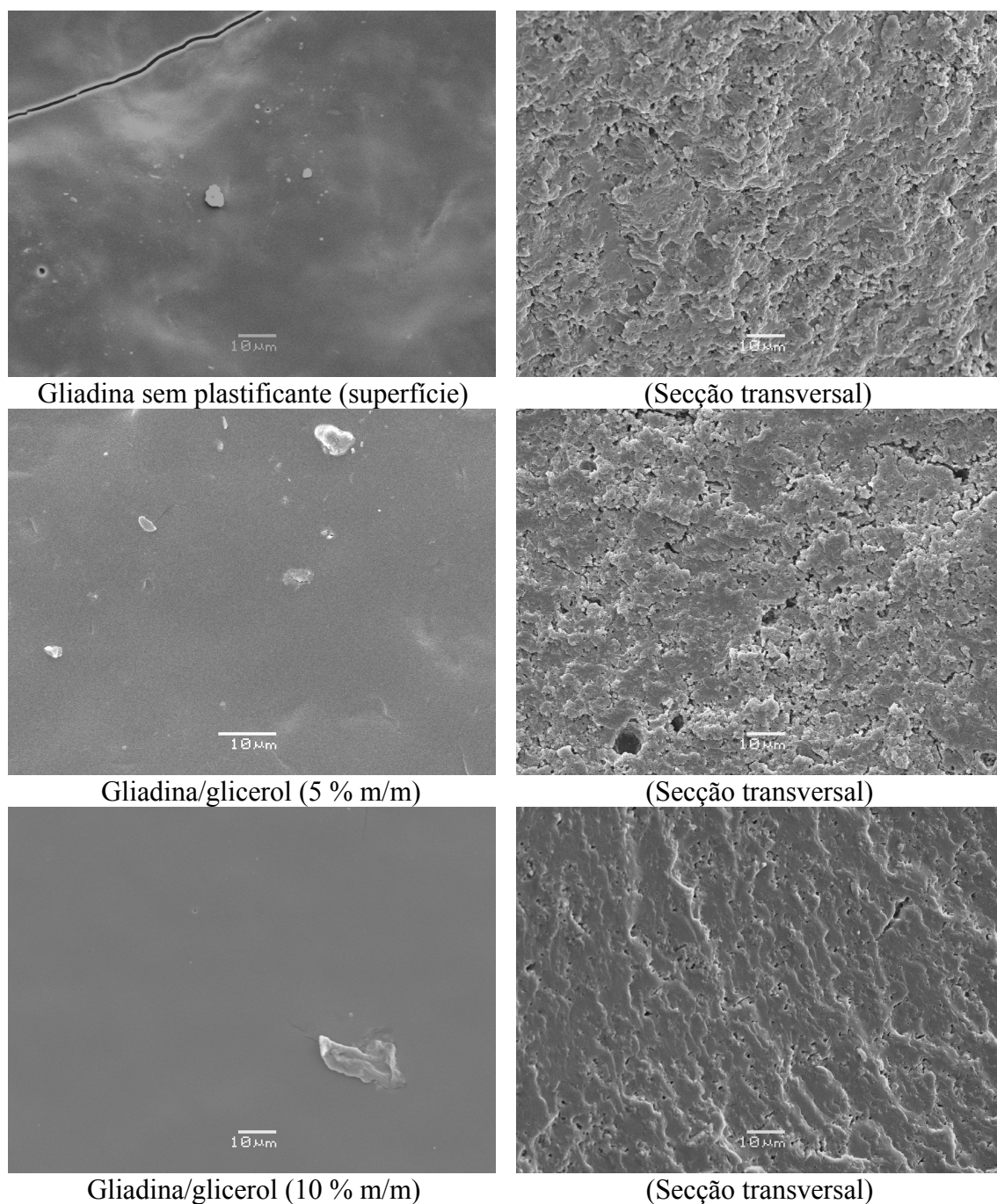


Figura 7.7 – Microscopia eletrônica de varredura dos filmes obtidos a partir de suspensões de gliadina não reticulada com diferentes concentrações de glicerol. As quantidades de plastificante encontram-se especificadas no canto inferior esquerdo de cada imagem.

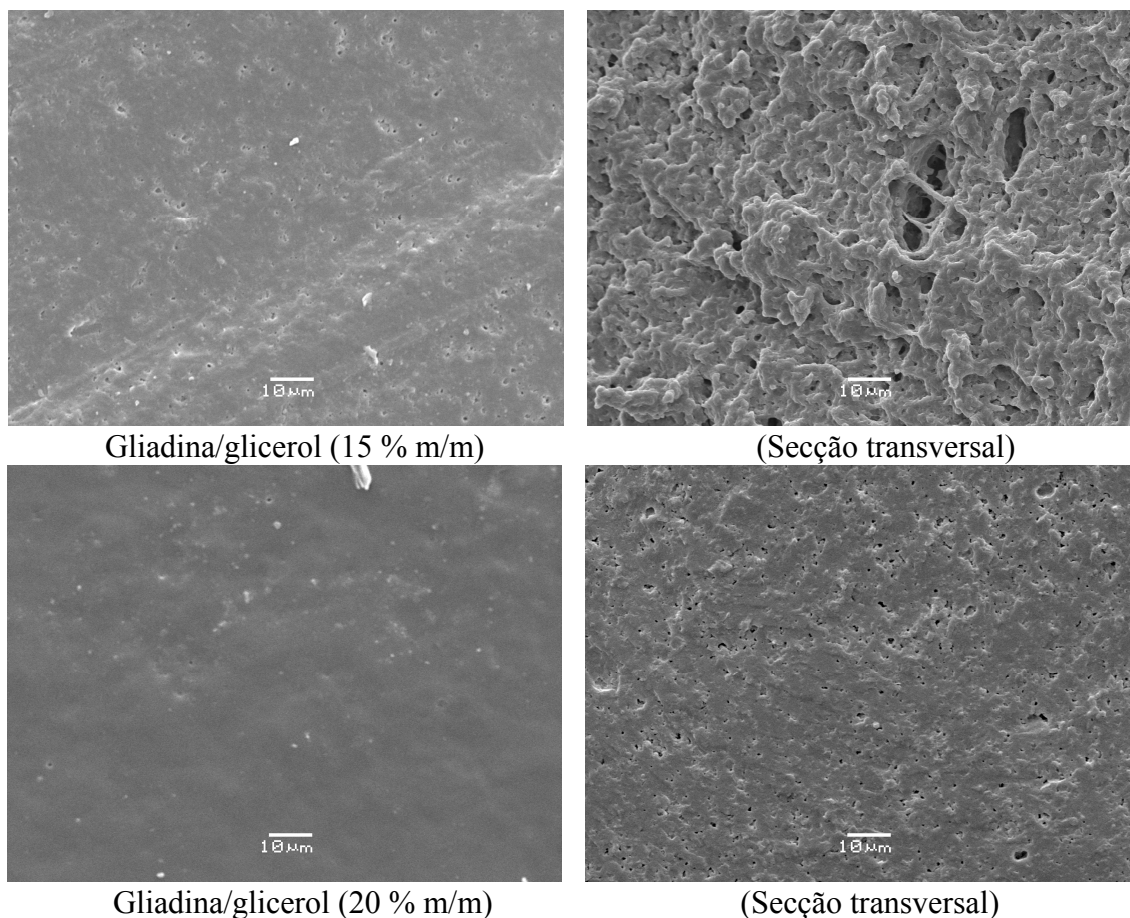


Figura 7.7 – (Continuação) Microscopia eletrônica de varredura dos filmes obtidos a partir de suspensões de gliadina não reticulada com diferentes concentrações de glicerol. As quantidades de plastificante encontram-se especificadas no canto inferior esquerdo de cada imagem.

A secção transversal do filme em ausência de glicerol mostra alguma rugosidade com a presença de poros escassos. Com a adição de 5 % de plastificante, nota-se o aumento dos poros e também a presença de alguns “caminhos” ou tortuosidades, cujo surgimento pode ter sido originado pela junção de poros adjacentes. A presença destes poros vai de encontro com o aumento na solubilidade dos mesmos (Figura 7.5).

Com o aumento de plastificante (10 %), o tamanho dos poros é reduzido e são percebidas também ondulações que contribuem para maior rugosidade. Este comportamento pode estar associado à redução na solubilidade observada para os filmes nesta concentração de glicerol.

Curiosamente, fora observada a 15 % de plastificante a presença de alguns poucos poros de tamanhos significativamente superiores aos até então existentes, os quais apareceram acompanhados de ondulações aumentadas que contribuíram para maior heterogeneidade na

imagem. A 20 % de glicerol a secção transversal volta a mostrar-se homogênea e a porosidade, embora semelhante àquela observada a 10 % de glicerol, não segue acompanhada de rugosidade significativa. Nestas duas concentrações de plastificante a solubilidade dos filmes é bastante aumentada, e é interessante notar que embora o filme de gliadina a 15 % de glicerol apresenta uma heterogeneidade bastante pronunciada e também alguns poros de tamanho superior a todos os demais, a solubilidade do mesmo foi inferior ao filme com 20 % de glicerol. Tal fato pode estar indicando que a porosidade observada em ausência de rugosidades ou ondulações a 20 % de glicerol, contribuiu para o aumento característico na solubilidade dos filmes.

Os filmes reticulados com [EDC/NHS] (Figura 7.8) mostraram uma superfície homogênea nas concentrações de glicerol analisadas. No entanto, a secção transversal dos filmes em ausência de glicerol aparece com a presença de poros e rugosidade bastante característica. Nas concentrações de 15 e 20 % de glicerol, a rugosidade aumenta proporcionalmente, no entanto, os poros desaparecem independentemente da concentração de plastificante. Com o auxílio destas micrografias, pode-se lançar mão da hipótese de que o mecanismo de absorção de água nos filmes reticulados com [EDC/NHS] é diferente do mecanismo apresentado em ausência de reticulante.

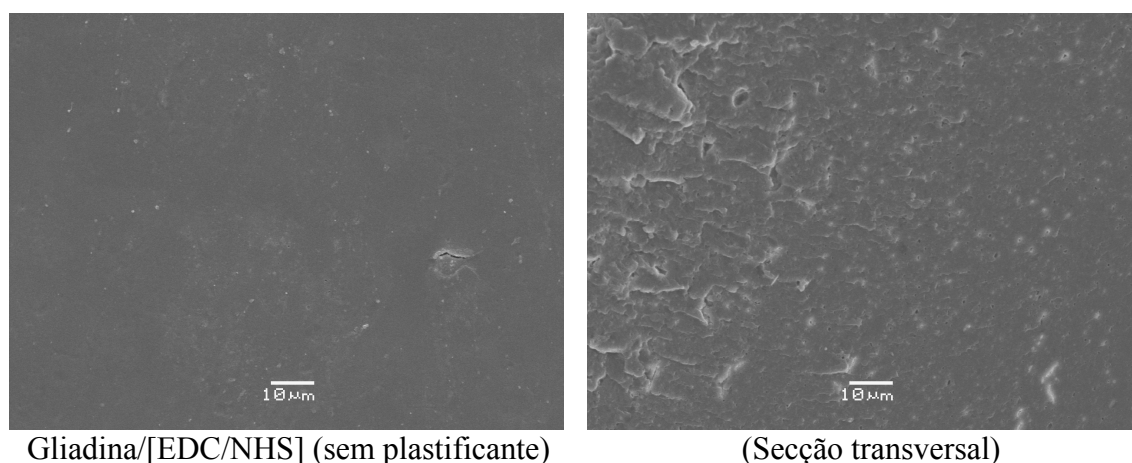


Figura 7.8 – Microscopia eletrônica de varredura dos filmes obtidos a partir de suspensões de gliadina reticuladas com [EDC/NHS] (3,0 % m/m) a diferentes concentrações de glicerol. As quantidades de plastificante encontram-se especificadas no canto inferior esquerdo a cada imagem.

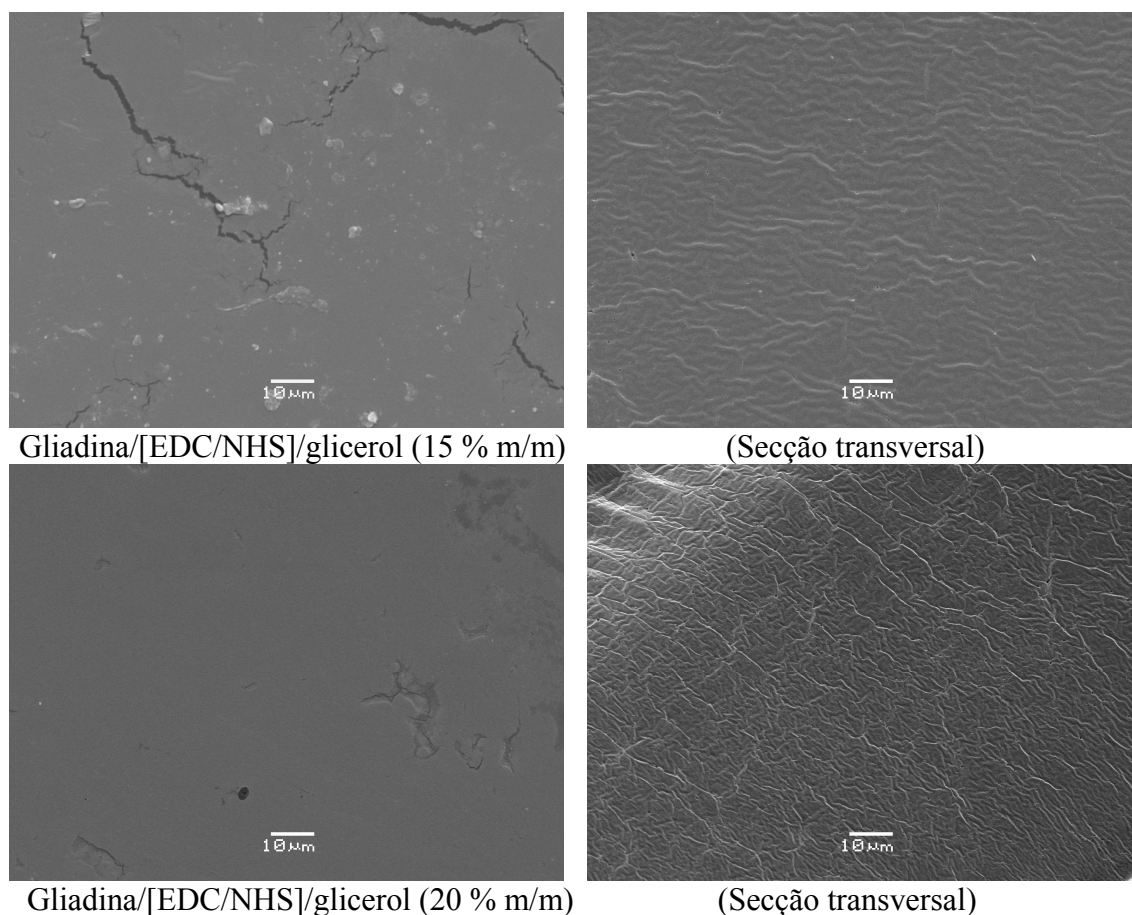


Figura 7.8 – (Continuação) Microscopia eletrônica de varredura dos filmes obtidos a partir de suspensões de gliadina reticuladas com [EDC/NHS] (3,0 % m/m) a diferentes concentrações de glicerol. As quantidades de plastificante encontram-se especificadas no canto inferior esquerdo a cada imagem.

A superfície dos filmes compostos por gliadina/L-cisteína (Figura 7.9) em concordância com os sistemas anteriores apresentara-se homogênea, no entanto, em ausência de glicerol apresentara alguns poucos poros os quais desaparecem com o aumento de plastificante no sistema. Embora tenha apresentado uma superfície homogênea os filmes em presença de 20 % de glicerol denotam uma superfície formada por pequenos aglomerados ou microaglomerações, que podem estar denotando uma região formada por um alto índice de ligações cruzadas.

A secção transversal em ausência de glicerol denota maior rugosidade e pouca homogeneidade, em comparação aos filmes com concentrações superiores de plastificante. Tal avanço na rugosidade em ausência de glicerol pode estar relacionado à maior rigidez do filme conforme observado pelo valor superior do módulo de Young (Figura 7.4). Com a adição de glicerol aos filmes (15 e 20 %), há uma redução da rugosidade, no entanto, o filme



com 20 % de glicerol mostra um aumento na quantidade de poros, o que pode, portanto ter contribuído para o aumento da solubilidade deste em água.

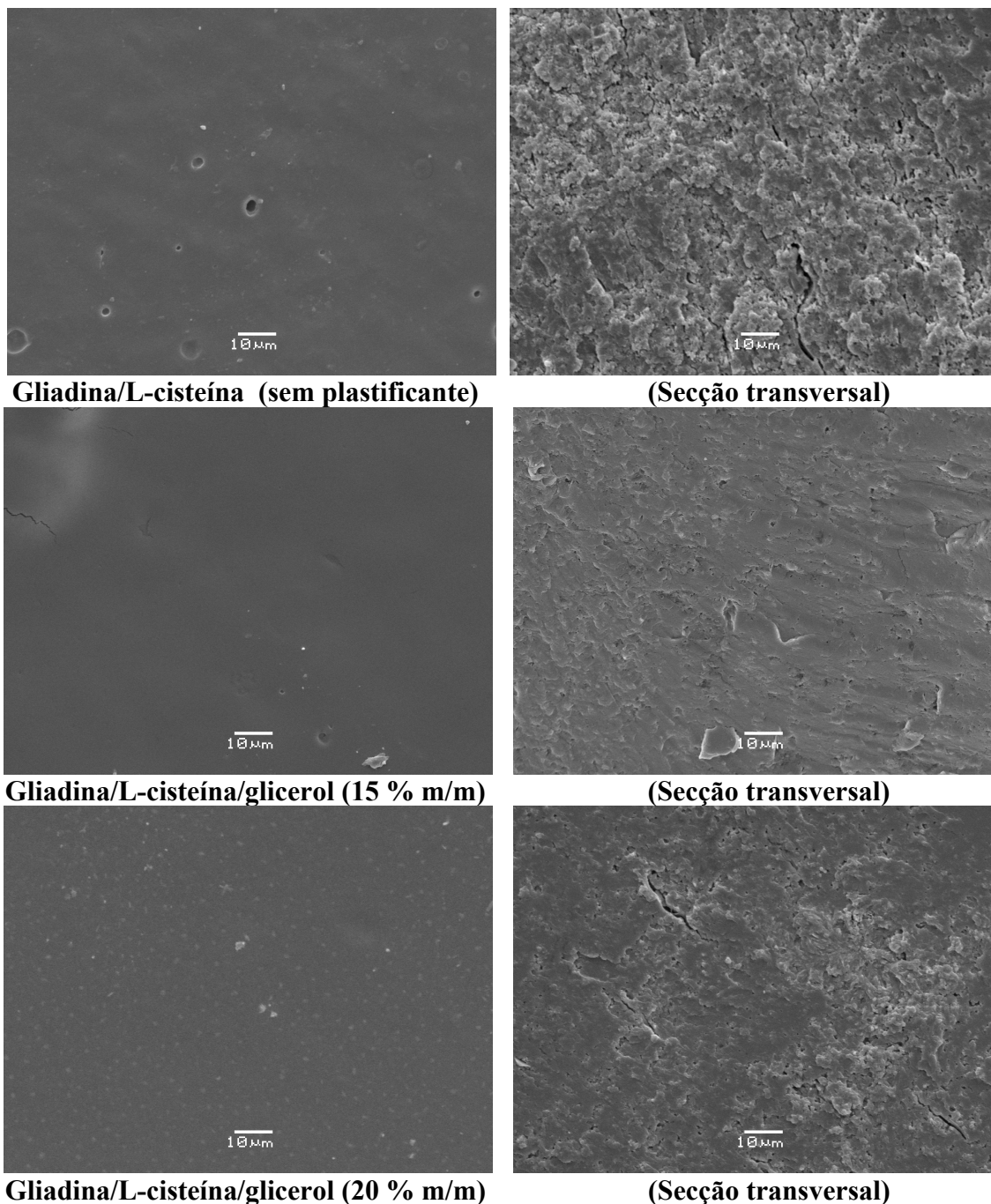


Figura 7.9 - Microscopia eletrônica de varredura da superfície e secção transversal dos filmes obtidos a partir das suspensões de gliadina reticulada com L-cisteína (1,5 % m/m) a diferentes concentrações de glicerol. As quantidades de plastificante encontram-se especificadas no canto inferior esquerdo a cada imagem.

#### 7.3.4 Isotermas de Adsorção

As isotermas têm sido utilizadas para descrever matematicamente a relação entre o conteúdo de umidade e a atividade de água de materiais biológicos. Portanto, são também importantes para filmes hidrofílicos uma vez que o conteúdo e atividade de água podem influenciar fortemente a funcionalidade destes materiais.<sup>106,107</sup> Para os filmes obtidos a base de gliadina, curvas características de isotermas de adsorção para os sistemas nativos e reticulados com [EDC/NHS] e L-cisteína, na presença de diferentes concentrações de glicerol e, em função da atividade de água foram obtidas. Para efeito de comparação e melhor ajuste aos dados experimentais encontrados, foram testados os modelos matemáticos de Oswin:

$$m = k \left( \frac{a_w}{1 - a_w} \right)^b \quad (7.4)$$

Onde:

m = g água/g matéria seca;

$a_w$  = atividade de água;

k e c = constantes obtidas através da inclinação e intercepto do gráfico de  $[\log m]$  versus  $\log [a_w/(1-a_w)]$ , respectivamente.

E também o modelo matemático de B.E.T (Brunauer-Emmet-Tellet):

$$\frac{a_w}{m(1 - a_w)} = \frac{C - 1}{m_1 C} a_w + \frac{1}{m_1 C} \quad (7.5)$$

Onde:

m = g água/g matéria seca;

$a_w$  = atividade de água;

$m_1$  = g água/g sólidos, na região de sorção primária;

C = constante

Os parâmetros matemáticos detectados mediante a aplicação destes dois métodos encontram-se resumidos na Tabela 7.1. Com base na observação dos mesmos e também nas curvas calculadas, o melhor ajuste aos dados se deu pelo método de Oswin. O valor teórico



encontrado mediante estes ajustes e a junção dos mesmos aos dados experimentais pode ser visualizado nas curvas presente nos gráficos da Figura 7.10.

Tabela 7.1 – Parâmetros de BET e Oswin teóricos obtidos para os filmes de gliadina nativos, reticulados com [EDC/NHS] (3,0 % m/m de gliadina), L-cisteína (1,5 % m/m de gliadina) e com diferentes concentrações de glicerol. As quantidades de glicerol estão de acordo com as denominações descritas na Tabela 5.1 (Capítulo 5).

Sistemas		BET		Oswin	
		m <sub>1</sub>	C	k	b
<i>Não reticulados</i>	1A	62,5	0,13	5,79	0,87
	2A	3,68	9,68	9,68	0,76
	3A	9,91	1,33	6,46	0,79
	4A	22,73	0,39	5,37	0,83
	5A	5,66	6,14	8,32	0,59
<i>[EDC/NHS] (3,0 %)*</i>	1B	-12,20	-0,99	3,59	1,57
	2B	15,38	13,0	3,88	0,95
	3B	12,50	8,89	6,90	0,86
	4B	7,69	1,86	6,28	0,77
	5B	6,25	3,20	6,46	0,73
<i>L-cisteína (1,5 %)*</i>	1C	-7,69	-0,87	6,41	0,98
	2C	-7,52	-0,95	7,19	1,02
	3C	-33,33	-0,30	7,31	0,90
	4C	-8,33	-0,80	6,21	0,96
	5C	-11,11	-0,50	7,50	1,16

\* (% m/m de gliadina);

Como pode ser observado, todas as curvas teoricamente calculadas exibiram uma concavidade característica de biofilmes sensíveis a presença de umidade.<sup>31,106</sup> Todavia, para os filmes de gliadina nativos e reticulados, sem a adição de plastificante (Figura 7.10A) nota-se que o conteúdo de umidade no equilíbrio cresce com o aumento de atividade de água, no

entanto, a valores de atividade de água superiores a 0,46 ocorre certo grau de desestabilização e os filmes reticulados apresentam maior conteúdo de umidade em comparação ao filme nativo.

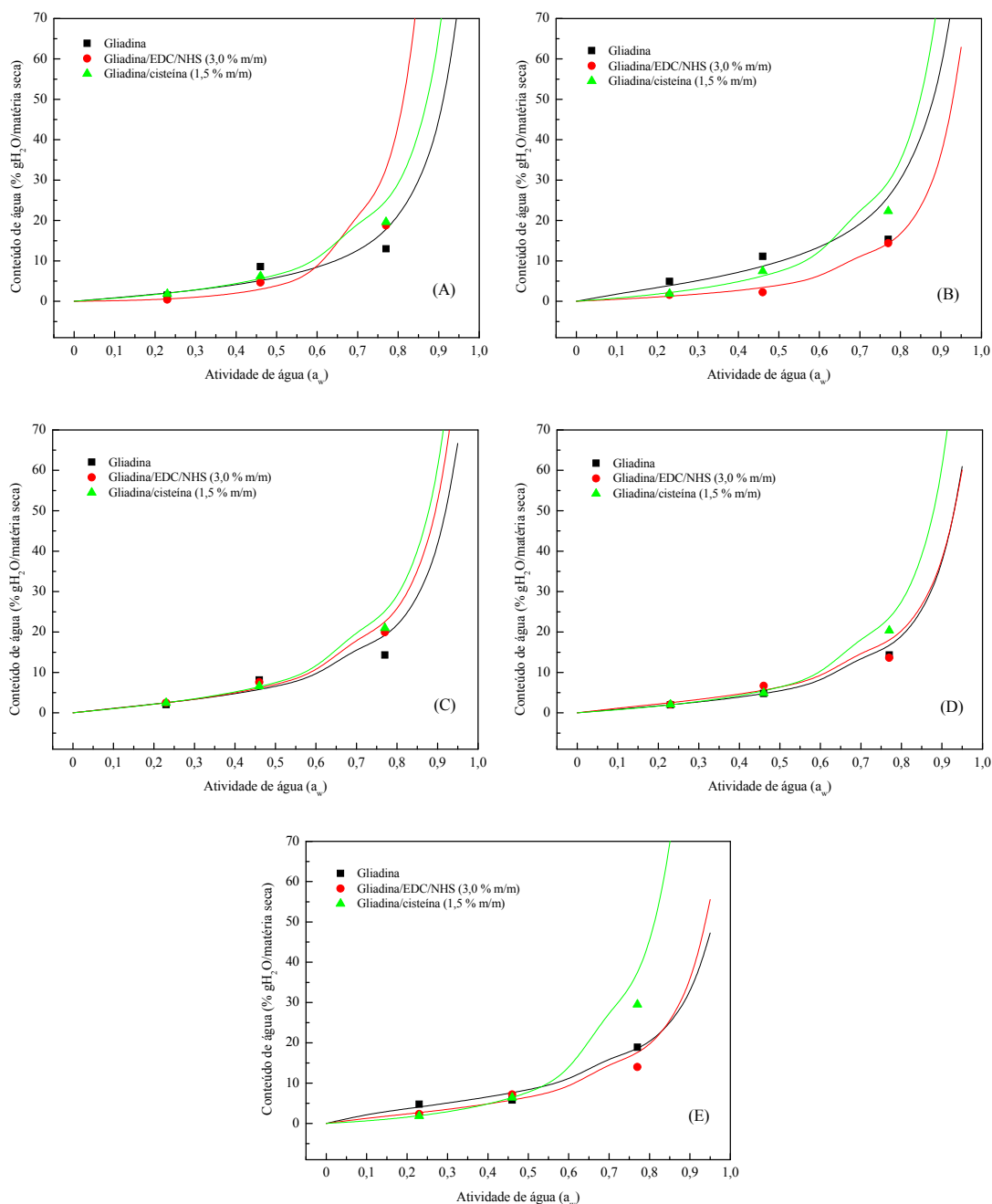


Figura 7.10 – Valores experimentais e teóricos das isotermas de adsorção de umidade a 23 °C para: (A) filmes de gliadina nativos e reticulados em ausência de glicerol; (B) com 5 % de glicerol (m/m de gliadina); (C) 10 % de glicerol (m/m de gliadina); (D) 15 % de glicerol (m/m de gliadina); (E) 20 % de glicerol (m/m de gliadina). Os símbolos representam os valores experimentais e as linhas indicam a curva teórica obtida pelo ajuste teórico de Oswin.

O aumento de plastificante nos filmes contribui para o crescimento no conteúdo de umidade em função da atividade de água. A adição de 5 % de glicerol faz com os filmes apresentem maiores diferenças entre si no que diz respeito ao conteúdo de umidade em uma mesma atividade de água. Contudo, quando  $a_w > 0,5$  ocorre novamente região de instabilidade no teor de umidade nos filmes. Este comportamento parece se repetir não somente com o emprego de 5 % de glicerol, mas também em concentrações superiores de glicerol. Contudo, é possível notar que a valores de  $a_w$  elevados e concentrações de plastificante maiores, o conteúdo de umidade nos filmes reticulados com L-cisteína, torna-se superior aos valores encontrados para os filmes nativos e reticulados com [EDC/NHS]. Na região onde  $a_w > 0,5$ ; o excesso de água parece estar presente como “água livre” condensada dentro de capilares presentes no filme. Em outras palavras, a água encontra-se mecanicamente presa ao filme, e é mantida apenas por forças fracas.<sup>108</sup>

Partindo-se deste pressuposto e analisando novamente os resultados obtidos para deformação na ruptura e módulo de Young (Figuras 7.3 e 7.4), nota-se que a 77,3 % de umidade relativa, os filmes reticulados por L-cisteína foram os que apresentaram maior deformação na ruptura. Ou seja, o excesso de água preso aos filmes também pode ter atuado como plastificante de modo a aumentar a capacidade de deformação dos mesmos.

Quanto aos filmes não reticulados, a 77,3 % de umidade relativa, estes apresentaram valores de módulo muito próximo aos detectados para os filmes de gliadina/[EDC/NHS]. Com estes resultados, é possível entender o porquê de estes filmes terem apresentado valores de umidade no equilíbrio muito próximos aos valores encontrados para os filmes reticulados por [EDC/NHS], quando em valores de  $a_w$  mais elevados.

Cabe ressaltar que a umidade no equilíbrio para os filmes nativos manteve-se superior aos filmes reticulados quando em valores de  $a_w < 0,5$  e até concentrações de glicerol inferiores a 10 %. A partir desta concentração, um comportamento anômalo passa a ser detectado o qual pode ser mais bem visualizado na Figura 7.11.

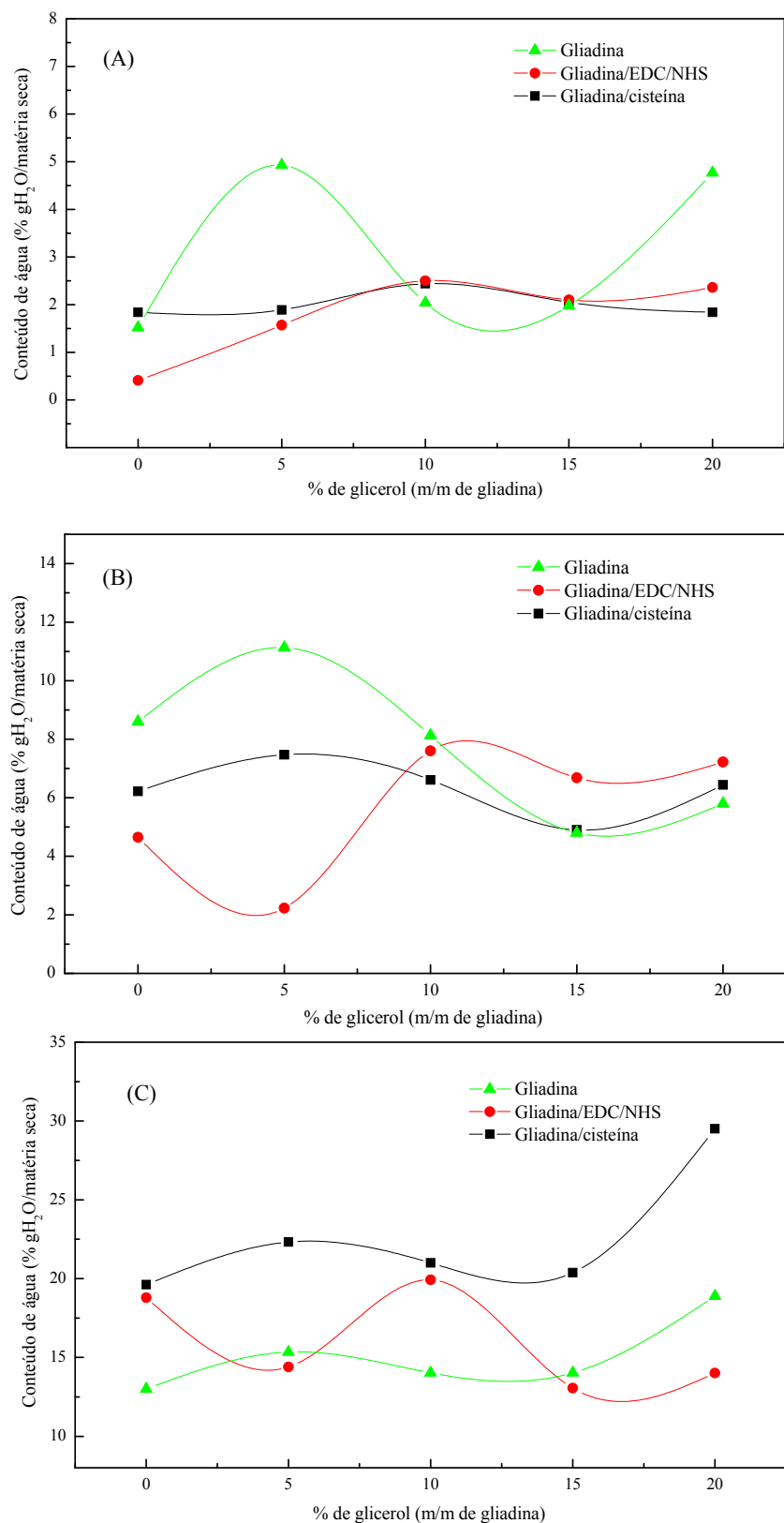


Figura 7.11 – Conteúdo de água absorvida nos filmes de gliadina nativa, gliadina/[EDC/NHS] (3,0 % m/m) e gliadina e L-cisteína (1,5 % m/m) com diferentes concentrações de glicerol e diferentes umidades relativas (%): (A) 23; (B) 46 e (C) 77,3.

Levando-se em consideração o efeito da adição de diferentes concentrações de glicerol aos filmes de gliadina, tanto nativos quanto reticulados, observa-se que não há uma tendência linear nos parâmetros de absorção de água. No entanto, a tendência do formato das curvas se mantém para cada filme mesmo a umidades relativas diferentes, mudando somente a quantidade de umidade absorvida.

Em umidade relativa menor (Figura 7.11A) os filmes parecem ser menos sensíveis a quantidade de água presente e, portanto, maior ênfase pode ser dada ao efeito do glicerol propriamente dito. Neste íterim, os filmes reticulados parecem absorver menos umidade e os filmes nativos parecem sofrer variações significativas em presença de plastificante. No entanto, concentrações de glicerol maiores que 10 % conferem “particularidades” aos filmes de gliadina e estas observações vão de encontro aos resultados encontrados para a maioria dos ensaios realizados neste trabalho.

Quando submetidos a uma umidade relativa maior (Figura 7.11B) os filmes de gliadina reticulados com [EDC/NHS] parecem sofrer maiores variações na absorção de umidade quando em presença de diferentes concentrações de glicerol enquanto que o sistema gliadina/*L*-cisteína parece demonstrar uma menor sensibilidade às variações de umidade. É interessante notar que a 46 % de umidade relativa, o efeito do glicerol na redução dos valores do módulo de Young é bastante significativo (Figura 7.4); enquanto que os valores de tensão máxima (Figura 7.2) mantêm-se similares a tendência observada nas curvas de absorção de água a 46 %, ou seja, a tensão máxima é reduzida com a adição de concentrações de plastificante maiores que 10 %.

No entanto, os filmes parecem mudar sobremaneira seus comportamentos com a elevação da umidade relativa (Figura 7.11C). Concordando com os resultados obtidos nas isotermas de adsorção e os ensaios mecânicos discutidos no item 7.2.1, os filmes de gliadina/*L*-cisteína parecem ter mudado abruptamente frente à umidade relativa de 77,3 %, passando a apresentar maior sensibilidade frente à umidade quando comparados aos filmes nativos e os reticulados com [EDC/NHS]. Já os filmes compostos por gliadina/[EDC/NHS], embora em menor proporção, também parecem se mostrar mais sensíveis às variações de umidade, no entanto, em comparação aos filmes nativos, só tem seus valores de absorção de água reduzidos em concentrações de plastificante de 5 e 15%.

Embora a elevação da umidade relativa faça com que ocorram mudanças nos padrões de absorção para todos os sistemas estudados, observa-se que a forma das curvas relativas aos filmes nativos e reticulados com *L*-cisteína, em umidade relativa de 77,3 % é bastante similar.

Tal coincidência pode ser explicada com base na análise microestrutural dos filmes formados nestas concentrações. Enquanto os filmes reticulados por [EDC/NHS] revelam a inexistência de poros e fraturas cobertas por rugosidades, os filmes nativos e aqueles reticulados por L-cisteína, apresentam certo grau de heterogeneidade e porosidade similares. Esta semelhança microestrutural pode estar fazendo com que os filmes, quando submetidos a umidades relativas maiores do que 50 % comportem-se de modo semelhante.

#### *7.4 Conclusões Parciais*

Os resultados dos ensaios mecânicos mostraram que os filmes nativos e reticulados sofrem influência da adição de diferentes concentrações de glicerol, mesmo quando submetidos a umidades relativas diferentes. Os filmes reticulados por [EDC/NHS] quando em 23 % de UR foram os que apresentaram valores superiores de tensão máxima, no entanto, este aumento só pode ser observado até concentrações de glicerol de 10 %. Os filmes de gliadina/L-cisteína exibiram o mesmo comportamento. O aumento da umidade relativa contribuiu para o aumento na tensão máxima dos filmes nativos, no entanto, efeito contrário fora observado para os filmes reticulados. Já a 77,3 % de umidade relativa, todos os filmes, reticulados ou não, apresentaram tensão reduzida e a proporção desta redução mantivera-se relacionada a quantidade de glicerol adicionado aos filmes.

Para deformação na ruptura fora observado efeito do glicerol e também da umidade relativa, ambos os filmes constituintes dos sistemas reticulados tiveram suas deformações quando comparados aos filmes nativos. Este comportamento pode ser explicado pela redução da extensibilidade nos filmes reticulados por [EDC/NHS] e L-cisteína. Esta restrição de mobilidade das cadeias moleculares nos filmes e a conseqüente redução em sua deformação fora atrelada à concentração de glicerol adicionado, mas ainda assim, a deformação na ruptura para os filmes reticulados mostrara-se sempre inferior àquela observada para os filmes nativos. A umidades relativas maiores fora observado o efeito plastificante da água a qual juntamente com o glicerol pode ter contribuído para maior mobilidade das cadeias.

Quanto aos valores de módulo, os filmes reticulados apresentaram valores superiores em umidades relativas menores e o mesmo parece ter sofrido uma nova redução com o aumento de glicerol nos filmes. Com o aumento da umidade relativa, os filmes reticulados com L-cisteína sofrem uma queda acentuada e com isto tornam-se os menos rígidos dentre os filmes estudados. No entanto, com o novo aumento da umidade, embora todos os filmes

tenham apresentado uma queda abrupta em seus valores de módulo, os filmes reticulados com [EDC/NHS], são os mais sensíveis à umidade e demonstram com isto serem os menos rígidos a umidades relativas elevadas.

Os filmes de gliadina não reticulados foram os que apresentaram maior solubilidade ( $21,9 \pm 2,0$  a  $34,4 \pm 2,0$  %) e menor intumescimento ( $99 \pm 1,9$  a  $85 \pm 2,0$ ), para toda a faixa de concentração de glicerol empregada. Além disso, a solubilidade fora aumentada proporcionalmente com o aumento de plastificante nos filmes. Este mesmo comportamento fora observado para os filmes reticulados por [EDC/NHS] e *L*-cisteína, no entanto, enquanto a solubilidade dos primeiros encontrara-se situada entre ( $15,4 \pm 1,0$  a  $23 \pm 2,0$ ), o segundo mostrara-se o menos solúvel dentre os filmes analisados neste trabalho ( $11,6 \pm 1,5$  a  $15,7 \pm 1,8$ ).

A análise microestrutural dos filmes possibilitou a diferenciação entre os filmes formados quanto a sua superfície e secção transversal. No entanto, os filmes nativos e reticulados com *L*-cisteína apresentaram certa similaridade morfológica apresentando porosidade e heterogeneidade característica. Por outro lado, os filmes formados por [EDC/NHS] revelam a ausência de porosidade e rugosidade aumentada com o aumento da quantidade de glicerol nos filmes.

As isotermas de adsorção permitiram avaliar o efeito da atividade de água nos filmes formados. Em valores de umidade relativa maiores, passa a existir uma zona de instabilidade que dificulta a interpretação dos resultados. No entanto, em valores de umidade relativa menor, é possível avaliar que os filmes nativos foram os que apresentaram maior adsorção de umidade. A absorção de água nos filmes com o aumento de glicerol não segue uma tendência linear e tal comportamento fora observado para todos os sistemas formados. Porém, a 77,3 % de umidade relativa, os sistemas compostos por gliadina e gliadina/*L*-cisteína embora tenham apresentado valores de absorção distintos apresentaram padrões de curva similares o que pode ter sido um resultado da semelhança microestrutural destes filmes.

### CONCLUSÕES

No presente estudo, a técnica de espalhamento de raios X a baixos ângulos (SAXS) mostrou ser uma importante ferramenta na investigação de suspensões de gliadina nativa e modificada pela presença dos reticulantes [EDC/NHS] e *L*-cisteína. As variações referentes a estes valores deram-se devido à presença de plastificante e, nos casos dos sistemas reticulados, também devido à presença de [EDC/NHS] e *L*-cisteína. De forma geral, a presença do glicerol e diferenças em sua concentração parecem ter exercido um papel importante para que o processo de reticulação fosse mais efetivo.

A análise de Kratky confirmou que as suspensões de gliadina não modificadas e os dois sistemas reticulados tiveram suas estruturas parcialmente desenoveladas, porém ainda com manutenção de sua forma globular. No entanto, o sistema gliadina/[EDC/NHS] na ausência de plastificante, mostrou um quase completo desenovelamento em sua forma global assumindo uma configuração aleatória e, demonstrando mais uma vez a importância do glicerol no processo de reticulação.

Os experimentos reológicos mostraram que a suspensão formada por gliadina/*L*-cisteína apresentou maior viscosidade, comprovando o efeito da *L*-cisteína na reticulação. No sistema não reticulado ou nativo, o aumento da concentração de glicerol reduziu os valores de viscosidade e o mesmo comportamento foi encontrado na suspensão modificada pela presença de *L*-cisteína. Os padrões observados nos perfis das curvas de viscosidade tanto para o sistema nativo quanto aquele reticulado por *L*-cisteína, foram característicos de materiais pseudoplásticos.

O sistema B (gliadina/[EDC/NHS]), revelou-se dependente não somente do cisalhamento, mas também do tempo, e suas curvas apresentaram uma volta característica ou *looping*, referente ao fenômeno de histerese, dependendo da concentração de glicerol empregada. Seus valores de viscosidade foram os menores observados em comparação aos sistemas A e C e sugere-se que este comportamento possa ser explicado, em parte, pela estrutura do EDC, solúvel em água e com um íon monovalente considerado grande como o íon cloreto (Cl<sup>-</sup>).



A dependência de  $G'$ ,  $G''$  e  $\tan \delta$  em função do tempo nos experimentos oscilatórios revelou que o sistema A, tanto na ausência quanto presença de glicerol, apresentaram transições sol-gel e ainda, a presença de três regiões ou domínios no padrão de suas curvas. A primeira região, caracterizada como um período de indução no qual  $G'$  e  $G''$  não mudam significativamente com o tempo; a segunda, na qual se inicia a estrutura da rede tridimensional e o módulo elástico ( $G'$ ) aumenta paulatinamente com o tempo, e a região III, onde se constata diferenças no sistema A quanto a estabilidade do gel formado, em função da presença ou ausência de glicerol.

O sistema gliadina/[EDC/NHS] na concentração 3,0 % de reticulante (m/m de gliadina), apresentou os maiores valores de módulo ( $G'$  e  $G''$ ), seguidos pelas concentrações 1,5; 6,0 % e 12 %. Para toda a faixa de concentração de reticulante empregada foi observado o brando aumento de  $G'$  em função do tempo, enquanto que as mudanças para  $G''$  seguiram o mesmo comportamento em ordem de grandeza maior, sem qualquer surgimento de transição sol-gel. Vários fatores foram discutidos neste capítulo e podem ter sido responsáveis pelo desencadeamento deste comportamento, no entanto, todos levam em consideração a possibilidade da formação de pequenos agregados localizados entre os espaços situados entre as cadeias distribuídas randomicamente ( $G'' > G'$ ).

As suspensões de gliadina e *L*-cisteína com e sem a presença de glicerol, mostraram o aparecimento de uma transição sol-gel para a toda a faixa de concentração de *L*-cisteína empregada. A variação no aparecimento destas transições deu-se em função da concentração de *L*-cisteína e também mostraram certo grau de variação devido à presença de glicerol. Todavia, todas as mudanças ocorridas no comportamento da suspensão de gliadina em presença de *L*-cisteína estão relacionadas principalmente à formação de ligações dissulfeto intermoleculares durante o processo de solubilização das proteínas em pH básico. Por esta razão, considerou-se que a concentração de *L*-cisteína foi de fundamental importância no comportamento elástico das suspensões, e por esta razão, concentrações muito baixas ou demasiadamente altas podem ter levado à ineficiência no processo de reticulação.

Os estudos de estabilidade térmica mostraram que a redução da  $T_g$  para os filmes reticulados foi proporcional a quantidade de plastificante empregada. Estas mudanças também foram observadas o sistema reticulado com [EDC/NHS], no entanto, toda a faixa de temperatura manteve-se acima das observadas para os filmes não reticulados.

O sistema composto por gliadina e *L*-cisteína, apresentou as maiores temperaturas de

transição vítrea demonstrando que a *L*-cisteína foi capaz de promover a formação de agregados mais resistentes à ação da temperatura. No entanto, ao contrário do observado para os sistemas A e B, as variações na  $T_g$  não se deram proporcionalmente a concentração de glicerol. O emprego de 10 % de plastificante parece ter colaborado para um equilíbrio de interações que levaram a uma conformação mais estável e um maior grau de empacotamento das cadeias.

A adição de glicerol promoveu a desestabilização na temperatura de degradação térmica dos filmes e a quantidade de massa residual diminuiu com o aumento de plastificante. No sistema A, a redução na temperatura ocorreu de maneira gradual, enquanto que para o sistema B foi menos pronunciada e para o sistema C observou-se uma significativa desestabilização térmica para concentrações elevadas de plastificante.

Acredita-se que este comportamento esteja relacionado com o volume livre das macromoléculas de gliadina, ou seja, ao elevar-se a concentração de glicerol há um favorecimento das interações proteína-plastificante em detrimento das interações proteína-proteína. Ante este fato, os segmentos das cadeias de gliadina movimentam-se com maior liberdade durante o aquecimento, provocando maiores polarizações das ligações peptídicas e consequentemente, uma redução na estabilidade térmica. Além disso, os segmentos de baixa massa molar formados durante a decomposição encontram maior espaço livre para se difundirem ao longo do material até passarem à fase gasosa, o que provoca uma perda de massa em temperaturas menores.

As análises espectroscópicas empregadas mostraram que o sistema não reticulado apresentou diferenças nas bandas de absorção em função do tratamento térmico a 55 °C. De maneira geral foram observadas bandas nas regiões de número de onda situado entre 2800-3600  $\text{cm}^{-1}$ . Estas bandas foram atribuídas às vibrações de estiramento de O-H e N-H livres, enquanto que uma pequena banda em 2800-3000  $\text{cm}^{-1}$  foi atribuída ao estiramento C-H. Os filmes não reticulados também apresentaram em 1072  $\text{cm}^{-1}$  uma banda característica de estiramento C-N de aminas; além de mostrarem bandas de absorção mais específicas na região de amida I (1650  $\text{cm}^{-1}$ ), relacionadas à vibração do estiramento C=O e C-N e; amida II, referente à deformação angular N-H (1540 e 1560  $\text{cm}^{-1}$ ) e estiramento C-N. O processo de avaliação das bandas de amida I e II mostrou-se fundamental para elucidar diferenças ocorridas em função do aquecimento das suspensões, antes das mesmas serem submetidas à evaporação.

Ao contrário do processo de reticulação promovido no sistema B, a reação entre a

gliadina e *L*-cisteína parece não resultar em novos picos de absorção na região espectral. A intensidade relativa dos picos mostrou-se sempre inferior àquela observada para os filmes não reticulados até concentrações de glicerol inferiores a 15 %, quando então a intensidade das bandas para o filme reticulado sobrepõe-se àquela dos filmes não tratados com *L*-cisteína. Em concentrações de glicerol superiores, a diferença entre as intensidades cai novamente, no entanto, com uma discreta sobreposição de intensidade para o filme reticulado. Parece que na presença de 10 % de glicerol o sistema atinge certa estabilidade contribuindo para o aumento na intensidade das bandas e também para diferenças nos picos de absorção de amida I e II.

Os resultados dos ensaios mecânicos mostraram que os filmes nativos e reticulados sofrem influência da adição de diferentes concentrações de glicerol, mesmo quando submetidos a umidades relativas diferentes. Os filmes reticulados por [EDC/NHS] quando em 23 % de UR foram os que apresentaram valores superiores de tensão máxima, no entanto, este aumento só pode ser observado até concentrações de glicerol de 10 %. Os filmes de gliadina/*L*-cisteína exibiram o mesmo comportamento. O aumento da umidade relativa contribuiu para o aumento na tensão máxima dos filmes nativos, no entanto, efeito contrário fora observado para os filmes reticulados. Já a 77,3 % de umidade relativa, todos os filmes, reticulados ou não, apresentaram tensão reduzida e a proporção desta redução mantivera-se relacionada a quantidade de glicerol adicionado aos filmes.

Os filmes de gliadina não reticulados foram os que apresentaram maior solubilidade ( $21,9 \pm 2,0$  a  $34,4 \pm 2,0$  %) e menor intumescimento ( $99 \pm 1,9$  a  $85 \pm 2,0$ ), para toda a faixa de concentração de glicerol empregada. Além disso, a solubilidade fora aumentada proporcionalmente com o aumento de plastificante nos filmes. Este mesmo comportamento fora observado para os filmes reticulados por [EDC/NHS] e *L*-cisteína, no entanto, enquanto a solubilidade dos primeiros encontrara-se situada entre ( $15,4 \pm 1,0$  a  $23 \pm 2,0$ ), o segundo mostrara-se o menos solúvel dentre os filmes analisados neste trabalho ( $11,6 \pm 1,5$  a  $15,7 \pm 1,8$ ).

A análise microestrutural dos filmes possibilitou a diferenciação entre os filmes formados quanto a sua superfície e secção transversal. No entanto, os filmes nativos e reticulados com *L*-cisteína apresentaram certa similaridade morfológica apresentando porosidade e heterogeneidade característica. Por outro lado, os filmes formados por [EDC/NHS] revelam a ausência de porosidade e rugosidade aumentada com o aumento da quantidade de glicerol nos filmes.

As isotermas de adsorção permitiram avaliar o efeito da atividade de água nos filmes formados. Em valores de umidade relativa maiores, passa a existir uma zona de instabilidade que dificulta a interpretação dos resultados. No entanto, em valores de umidade relativa menor, é possível avaliar que os filmes nativos foram os que apresentaram maior adsorção de umidade. A absorção de água nos filmes com o aumento de glicerol não segue uma tendência linear e tal comportamento foi observado para todos os sistemas formados. Porém, a 77,3 % de umidade relativa, os sistemas compostos por gliadina e gliadina/L-cisteína embora tenham apresentado valores de absorção distintos apresentaram padrões de curva similares o que pode ter sido um resultado da semelhança microestrutural destes filmes.

## REFERÊNCIAS

1. WU, Y.; WELLER, C. L.; HAMOUZ, F.; CUPPET, S. L.; SCHNEPF, M. *Development and applications of multicomponent edible coatings and films: a review*. **Advances in Food Science and Nutrition Research**, v.44, p.347-394, 2002.
2. PARK, H. J. *Development of advanced edible coatings for fruits*. **Trends in Food Science and Nutrition**, v.10, p.254-260, 1999.
3. PETERSEN, K.; NIELSEN, P. V.; BERTELSEN, G.; LAWOTHER, M.; OLSEN, M. B.; NILSSON, N. N.; MORTENSEN, G. *Potential of biobased materials for food packaging*. **Trends in Food Science and Nutrition**, v.10, p.52-68, 1999.
4. THARANATHAN, R. N. *Biodegradable films and composite coatings: past, present and future*. **Trends in Food Science and Nutrition**, v.14, p.71-78, 2003.
5. DEBEAUFORT, F.; QUEZADA-GALLO, J. A.; VOILLEY, A. *Edible films and coatings: Tomorrow's packagings: a review*. **Critical Reviews in Food Science**, v.38, n.4, p.299-313, 1998.
6. FELDMAN, D. *Polymer barrier films*. **Journal of Polymers and the Environment**, v.9, n.2, p.49-55, 2001.
7. CHANDRA, R.; RUSTGI, R. *Biodegradable polymers*. **Progress in Polymer Science**, v.23, p.1273-1335, 1998.
8. GENNADIOS, A. *Protein-based films and coatings*. New York: CRC Press, 2002, 648p.
9. MANGATA, J. I.; BAUDUIN, G.; BOUTEVIN, B. *Bilayer films composed of wheat gluten and functionalized polyethylene: permeability and other physical properties*. **Polymer Bulletin**, v.43, p.441-448, 1999.
10. SUDHAMANI, S. R.; PRASAD, M. S.; SANKAR, K. U. *DSC and FTIR studies on gellan and polyvinyl alcohol (PVA) blend films*. **Food Hydrocolloids**, v.17, p.245-250, 2003.
11. GUILBERT, S.; BIQUET, B. *Food packaging and preservation*, In: **Packaging and Preservation**. London: Elsevier Applied Science Publishers, 1986, p.371p.
12. BILLMEYER, F. W. *Textbook of Polymer Science*. New York: Wiley, 1984, 578p.
13. LUCAS, E. F.; SOARES, B. G.; MONTEIRO, E. E. C. *Caracterização de polímeros*. Rio de Janeiro: e-Papers, 2001, 366p.

14. DONHOWE, I. G.; FENNEMA, O. *Edible films and coatings: characteristics, formation, definitions, and testing methods*, In: KROCHTA, J. M.; BALDEWIN, E. A. NISPEROS-CARRIEDO, M. O. **Edible coatings and films to improve quality**. Lancaster: Technomic, 1994, pp.5-7.
15. HATAKEYAMA, T.; QUIN, F. X. *Thermal analysis: Fundamentals and Applications to Polymer Science*. 2ed., Chichester: John Wiley & Sons Ltd., 1994, 174p.
16. MANGATA, J. I.; BAUDUIN, G.; BOUTEVIN, B.; GONTARD, N. *New plasticizers for wheat gluten films*. **European Polymer Journal**, v.37, p.1533-1541, 2001.
17. MANGAVEL, C.; BARBOT, J.; GUÉGUEN, J.; POPINEAU, Y. *Molecular determinants of the influence of hydrophilic plasticizers on the mechanical properties of cast wheat gluten films*. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.51, p.1447-1452, 2003.
18. TSENOGLOU, C. *Rubber elasticity modulus of interpenetrating heteropolymer networks*, In: DICKIE, R. A.; LABANA, S. S. BAUER, R. S. **Cross-linked Polymers: Chemistry, Properties and Applications**. Washington: American Chemical Society, 1988, pp.60-61.
19. EISENBERG, A. *The glassy state and the glass transition*, In: MARK, J. E.; EISENBERG, A.; GRAESSLEY, W. W.; MALDELKERN, L.; SAMULSKI, E. T.; KOENIG, J. L. WIGNAL, G. D. **Physical Properties of Polymers**. Washington: American Chemical Society, 1993, pp.88-89.
20. AKELAH, A.; MOET, A. *Properties and characterization of functionalized polymers*. London: Chapman and Hall, 1990, 29-30.
21. COMA, V.; SEBTI, I.; PARDON, P.; PICHAVANT, F. H.; DESCHAMPS, A. *Film properties from crosslinking of cellulosic derivatives with a polyfunctional carboxylic acid*. **Carbohydrate Polymers**, v.51, p.265-271, 2003.
22. DELVILLE, J.; JOLY, C.; DOLE, P.; BLIARD, C. *Solid state photocrosslinked starch based films: a new family of homogeneous modified starches*. **Carbohydrate Polymers**, v.49, p.71-81, 2002.
23. DE CARVALHO, R. A.; GROSSO, C. R. F. *Characterization of gelatin based films modified with transglutaminase, glyoxal and formaldehyde*. **Food Hydrocolloids**, v.18, p.717-726, 2004.
24. RHIM, J. W.; GENNADIOS, A.; FU, D.; WELLER, C. L.; HANNA, M. A. *Properties of ultraviolet irradiated protein films*. **Lebensm.-Wiss. u.-Technol.**, v.32, p.129-133, 1999.

25. TURHAN, N. K.; SAHBAZ, F. *Water vapor permeability, tensile properties and solubility of methylcellulose-based edible films*. **Journal of Food Engineering**, v.61, p.459-466, 2004.
26. BARRETO, P. L. M.; PIRES, A. T. N.; SOLDI, V. *Thermal degradation of edible films based on milk proteins and gelatin in inert atmosphere*. **Polymer Degradation and Stability**, v.79, p.147-152, 2003.
27. SOARES, R. M. D.; LIMA, A. M. F.; OLIVEIRA, R. V. B.; PIRES, A. T. N.; SOLDI, V. *Thermal degradation of biodegradable edible films based on xanthan and starches from different sources* **Polymer Degradation and Stability**, v.90, n.3, p.449-454, 2005.
28. SCHMIDT, V.; GIACOMELLI, C.; SOLDI, V. *Thermal stability of films formed by soy protein isolated-sodium dodecyl sulfate*. **Polymer Degradation and Stability**, v.87, p.25-31, 2005.
29. KROCHTA, J. M. *Protein as raw materials form films and coatings: definitions, current status, and opportunities*, In: GENNADIOS, A. **Protein-Based Films**. New York: CRC Press, 2002, pp.1-32.
30. GUILBERT, S.; GONTARD, N.; MOREL, M. H.; CHALIER, P.; MICARD, V.; REDL, A. *Formation and properties of wheat gluten films and coatings*, In: GENNADIOS, A. **Protein Based Films and Coatings**. Washington: CRC press, 2002, pp.69-120.
31. GONTARD, N.; GUILBERT, S.; CUQ, J. L. *Water and glycerol as plasticizers affect mechanical and water vapor barrier properties of an edible wheat film*. **Journal of Food Science**, v.58, p.206-211, 1993.
32. ALI, Y.; GHORPADE, V. M.; HANNA, M. A. *Properties of thermally-treated wheat gluten films*. **Industrial Crops and Products**, v.6, p.177-184, 1997.
33. <http://www.science.org.au/sats2004/mackay.htm>. Acesso em: 25 de abril, 2007
34. LEHNINGER, A. L. N., D.L.; COX, M.M. *Principles of Biochemistry*. 2ed., New York: Worth Publishers, 1993, 1013.
35. D'OVIDIO, R.; MASCI, S. *The low molecular weight glutenin subunits of wheat gluten*. **Journal of Cereal Science**, v.39, p.321-339, 2004.
36. GONTARD, N.; MARCHESSEAU, C., J.L.S.; GUILBERT, S. *Water vapour permeability of edible bilayer films of wheat gluten and lipids*. **International Journal of Food Science and Technology**, v.30, p.49-56, 1995.

37. MANGATA, J. I.; BAUDUIN, G.; BOUTEVIN, B. *Bilayer films composed of wheat gluten films and UV-cured coating: water vapour permeability and other functional properties*. **Polymer Bulletin**, v.44, p.409-416, 2000.
38. MICARD, V.; GUILBERT, S. *Thermal behaviour of native and hydrophobized wheat gluten, gliadin and glutenin-rich ractions by modulated DSC*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.27, p.229-236, 2000.
39. MICARD, V.; BELAMRI, R.; MOREL, M.-H.; GUILBERT, S. *Properties of chemically and physically treated wheat gluten films*. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.48, p.2948-2953, 2000.
40. FAKHOURI, F. M.; TANADA-PALMU, P. S.; GROSSO, C. R. F. *Characterization of composite biofilms of wheat gluten and cellulose acetate phthalate*. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v.21, n.2, p.261-264, 2004.
41. KAYSERILIOGLU, B. S.; BAKIR, U.; YILMAZ, L.; AKKAS, N. *Drying temperature and relative humidity effects on wheat gluten film properties*. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.51, p.964-968, 2003.
42. KAYSERILIOGLU, B. S.; BAKIR, U.; YILMAZ, L.; AKKAS, N. *Use of xylan, an agricultural by-product, in wheat gluten based biodegradable films: mechanical, solubility and water vapor transfer rate properties*. **Bioresource Technology**, v.87, p.239-246, 2003.
43. LENS, J.-P.; DE GRAAF, W. M.; STEVELS, W. M.; DIETZ, C. H. J. T.; VERHELST, K. C. S.; VEREIJKEN, J. M.; KOLSTER, P. *Influence of processing and storage conditions on the mechanical and barrier properties of films cast from aqueous wheat gluten dispersions*. **Industrial Crops and Products**, v.17, p.119-130, 2003.
44. ROY, S.; GENNADIOS, A.; WELLER, C. L.; TESTIN, R. F. *Water vapour transport parameters of a cast wheat gluten film*. **Industrial Crops and Products**, v.11, p.43-50, 2000.
45. TANADA-PALMU, P. S.; GROSSO, C. R. F. *Wheat gluten composite and bilayer edible films: effect of lipid addition*. **Research and Advances in Agricultural & Food Chemistry**, v.3, p.53-59, 2002.
46. TROPINI, V.; LENS, J.-P.; MULDER, W. J.; SILVESTRE, F. *Wheat gluten films cross-linked with 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide and N-hydroxysuccinimide*. **Industrial Crops and Products**, v.20, n.3, p.281-289, 2004.
47. MOREL, M. H.; BONICEL, J.; MICARD, V.; GUILBERT, S. *Protein insolubilization and thiol oxidation in sulfite-treated wheat gluten films during aging at various*



- temperatures and relative humidities. Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v.48, p.182-186, 2000.
48. POMMET, M.; REDL, A.; MOREL, M. H.; GUILBERT, S. *Study of wheat gluten plasticization with fatty acids. Polymer*, v.44, p.115-122, 2003.
  49. DOMENEK, S.; FEUILLOLEY, P.; GRATRAUD, J.; MOREL, M. H. G.; GUILBERT, S. *Biodegradability of wheat gluten based bioplastics. Chemosphere*, v.54, p.551-559, 2004.
  50. <http://www.landfood.ubc.ca/courses/fnh/301/protein/protq4.htm>. Acesso em: 15 de julho, 2007
  51. MCMASTER, T.; MILES, M. J.; WANNERBERGER, L.; ELIASSON, A. C.; SHEWRY, P. R.; TATHAM, A. S. *Identification of microphases in mixed alpha and omega-gliadin protein films investigated by atomic force microscopy. Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v.47, p.5093-5099, 1999.
  52. WOERDEMAN, D. L.; VERAVERBEKE, W. S.; PARNAS, R. S.; JOHNSON, D.; DELCOUR, J. A.; VERPOES, I.; PLUMMER, C. J. G. *Designing new materials from wheat proteins. Biomacromolecules*, v.5, p.1262-1269, 2004.
  53. SHEWRY, P. R.; TATHAM, A. S. *Disulphide bonds in wheat gluten proteins. Journal of Cereal Science*, v.25, p.207-227, 1997.
  54. PÉZOLET, M.; BONENFANT, S.; DOUSSEAU, F.; POPINEAU, Y. *Conformational of wheat gluten proteins. Federation of European Biochemical Societies*, v.299, n.3, p.247-250, 1992.
  55. SÁNCHEZ, A. C.; POPINEAU, Y.; MANGAVEL, C.; LARRÉ, C.; GUÉGUEN, J. *Effect of different plasticizer on the mechanical and surface properties of wheat gliadin films. Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v.46, p.4539-4544, 1998.
  56. MANGAVEL, C.; BARBOT, J.; POPINEAU, Y.; GUÉGUEN, J. *Evolution of wheat gliadins conformation during film formation: A Fourier transform infrared study. Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v.49, p.867-872, 2001.
  57. <http://www.pdb.org>. Acesso em: 20 de março, 2007
  58. MUÑOZ, P. H.; KANAVOURAS, A.; PERRY, K. W. N.; GAVARA, R. *Development and characterization of biodegradable films made from wheat gluten protein fractions. Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v.51, p.7647-7654, 2003.
  59. MUÑOZ, P. H.; KANAVOURAS, A.; VILLALOBOS, R.; CHIRALT, A. *Characterization of biodegradable films obtained from cysteine-mediated polymerized gliadins. Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v.52, p.7897-7904, 2004.

60. MUÑOZ, P. H.; LÓPEZ-RUBIO, A.; LAGARÓN, J. M.; GAVARA, R. *Formaldehyde cross-linking of gliadin films: effects on mechanical and water barrier properties. Biomacromolecules*, v.5, p.415-421, 2004.
61. MUÑOZ, P. H.; LAGARÓN, J. M.; LÓPEZ-RUBIO, A.; GAVARA, R. *Gliadins polymerized with cysteine: effects on the physical and water barrier properties of derived films. Biomacromolecules*, v.5, p.1503-1510, 2004.
62. MUÑOZ, P. H.; VILLALOBOS, R.; CHIRALT, A. *Effect of cross-linking using aldehydes on properties of glutenin-rich films. Food Hydrocolloids*, v.18, n.3, p.403-411, 2004.
63. MUÑOZ, P. H.; VILLALOBOS, R.; CHIRALT, A. *Effect of thermal treatments on functional properties of edible films made from wheat gluten fractions. Food Hydrocolloids*, v.18, p.647-654, 2004.
64. WOLFFA, D.; CZAPLAB, S.; HEYERC, A. G.; RADOSTAD, S.; MISCHNICKE, P.; SPRINGER, J. *Globular shape of high molar mass inulin revealed by static light scattering and viscometry. Polymer*, v.41, p.8009-8016, 2000.
65. WINTER, R.; KOHLING, R. *Static and time-resolved synchrotron small-angle x-ray scattering studies of lyotropic lipid mesophases, model biomembranes and proteins in solution. Journal of Physics: Condensed Matter*, v.16, p.S327-S352, 2004.
66. SHAMAI, K.; SHIMONI, E.; BIANCO-PELED, H. *Small angle X-ray scattering of resistant starch type III. Biomacromolecules*, v.5, p.219-223, 2004.
67. YUGUCHI, Y.; URAKAWA, H.; KAJIWARA, K. *Structural characteristics of carrageenan gels: various types of counter ions. Food Hydrocolloids*, v.17, p.481-485, 2003.
68. POLIZELLI, M. A.; TELIS, V. R. N.; AMARAL, L. Q.; FEITOSA, E. *Formation and characterization of soy bean oil/surfactant/water microemulsions. Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, v.281, p.230-236, 2006.
69. WRIGLEY, C. W.; BIETZ, J. A. *Proteins and amino acids*. v.I, St. Paul: American Association of Cereal Chemists, Inc., 1988, 514p.
70. WIESER, H. *Chemistry of gluten proteins. Food Microbiology*, v.24, p.115-119, 2007.
71. CHOURPA, I.; DUCEL, V.; RICHARD, J.; DUBOIS, P.; BOURY, F. *Conformational modifications of  $\alpha$ -gliadin and globulin proteins upon complex coacervates formation with gum arabic as studied by Raman microspectroscopy. Biomacromolecules*, v.7, p.2616-2623, 2006.

72. WOLFFA, D. C., S.; HEYERC, A.G.; RADOSTAD, S.; MISCHNICKE, P.; SPRINGER, J. *Globular shape of high molar mass inulin revealed by static light scattering and viscometry*. **Polymer**, v.41, p.8009-8016, 2000.
73. KONNO, T.; KATAOKA, M.; KAMATARI, Y.; KANAORI, K.; NOSAKA, A.; AKASAKA, K. *Solution X-ray scattering analysis of cold- heat-, and urea-denatured states in a protein, streptomyces subtilisin inhibitor*. **Journal of Molecular Biology**, v.251, p.95-103, 1995.
74. SVERGUN, D. I.; KOCH, M. H. J. *Small-angle scattering studies of biological macromolecules in solution*. **Reports on Progress in Physics**, v.66, p.1735-1782, 2003.
75. THOMPSON, N. H.; MILES, M. J.; POPINEAU, Y.; JOHN, H.; SHEWRY, P.; THATAM, A. S. *Small angle X-ray scattering of wheat seed-storage proteins:  $\alpha$ -,  $\gamma$ - and  $\omega$ -gliadins and the high molecular weight (HMW) subunits of glutenin*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1430, p.359-366, 1999.
76. LI, M.; LEE, T. C. *Effect of cysteine on the molecular weight distribution and the disulfide cross-link of wheat flour proteins in extrudates*. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.46, p.846-853, 1998.
77. NAKAJIMA, N.; IKADA, Y. *Mechanism of amide formation by carbodiimide for bioconjugation in aqueous media*. **Bioconjugate Chemistry**, v.6, p.123-130, 1995.
78. LAGRAIN, B.; THEWISSEN, B. G.; BRIJS, K.; DELCOUR, J. A. *Mechanism of gliadin-glutenin cross-linking during hydrothermal treatment*. **Food Chemistry**, v.107, p.753-760, 2008.
79. DA SILVA, M. A.; ITRI, R.; ARÊAS, E. P. G. *Lysozyme viscoelastic matrices in tetrametyurea/water media: a small angle x-ray scattering study*. **Biophysical Chemistry**, v.99, p.169-179, 2002.
80. SANO, Y.; INOUE, H.; HIRAGI, Y. *Differences of reconstitution process between tobacco mosaic virus and cucumber green mottle mosaic virus by synchrotron small angle X-ray scattering using low-temperature quenching*. **Journal of Protein Chemistry**, v.18, n.7, p.801-805, 1999.
81. SEMISOTNOV, G. V.; KIHARA, H.; KOTOVA, N. V.; KIMURA, K.; AMEMIYA, Y.; WAKABAYASHI, K.; SERDYUK, I. N.; TIMCHENKO, A. A.; CHIBA, K.; NIKAIDO, K.; IKURA, T.; KUWAJIMA, K. *Protein globularization during folding. A study by synchrotron small-angle X-ray scattering*. **Journal of Molecular Biology**, v.262, p.559-574, 1996.

82. SANO, Y.; INOUE, H.; HIRAGI, Y.; URAKAWA, H.; KAJIWARA, K. *Solution X-ray scattering study of reconstitution process of tobacco mosaic virus particle using low-temperature quenching*. **Biophysical Chemistry**, v.55, p.239-245, 1995.
83. FLANAGAN, J. M.; KATAOKA, M.; FUJISAWA, T.; ELGELMAN, D. M. *Mutation can cause large changes in the conformation of a denatured protein*. **Biochemistry Journal**, v.32, p.10359-10370, 1993.
84. KATAOKA, M.; NISHII, I.; FUJISAWA, T.; UEKI, T.; TOKUNAGA, F.; GOTO, Y. *Structural characterization of the molten globule and native states of apomyoglobin by solution X-ray scattering*. **Journal of Molecular Biology**, v.249, p.215-228, 1995.
85. JANG, D. S.; JU LEE, H.; LEE, B.; HONG, B. H.; CHA, H. J.; YOON, Y. J.; LIM, K.; YOON, Y. J.; KIM, J.; REE, M.; LEE, B.; CHOI, K. Y. *Detection of an intermediate during the unfolding process of the dimeric ketosteroid isomerase*. **FEBS Letters**, v.580, p.4166-4171, 2006.
86. FINET, S.; SKOURI-PANET, F.; CASSELYN, M.; BONNETÉ, M.; TARDIEU, A. *The Hofmeister effect as seen by SAXS in protein solutions*. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v.9, p.112-116, 2004.
87. FURUKAWA, J. *Physical Chemistry of Polymer Rheology*. 1ed., New York: Springer, 2003, 275p.
88. LAEMMLI, U. K. *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. **Nature**, v.227, n.5259, p.680-685, 1970.
89. OFNER, C. M.; BUBNIS, W. A. *Chemical and swelling evaluations of amino group crosslinking in gelatin and modified gelatin matrices*. **Pharmaceutical Research**, v.13, n.12, p.1821-1827, 1996.
90. BARONE, J. R. D., K.; SCHMIDT, W.F. **J. Agric. Food Chem.**, v.54,, p.5393-5399., 2006
91. SARKAR, N. *Kinetics of thermal gelation of methylcellulose and hydroxypropylmethylcellulose in aqueous solutions*. **Carbohydrate Polymers**, v.26, p.195-203, 1995.
92. TOTOSAUS, A.; MONTEJANO, J. G.; SALAZAR, J. A.; GUERRERO, I. *A review of physical and chemical protein-gel induction*. **International Journal of Food Science and Technology**, v.37, p.589-601, 2002.
93. WANG, J. S.; ZHAO, M. M.; YANG, X. Q.; JIANG, Y. M.; CHUN, C. *Gelation behavior of wheat gluten by heat treatment followed by transglutaminase cross-linking reaction*. **Food Hydrocolloids**, v.21, p.174-179, 2007.

94. KATKOV, I. I.; LEVINE, F. *Prediction of the glass transition temperature of water solutions: comparison of different models*. **Cryobiology**, v.49, p.62-82, 2004.
95. IRISSIN-MANGATA, J.; BAUDUIN, G.; BOUTEVIN, B.; GONTARD, N. *New plasticizers for wheat gluten films*. **European Polymer Journal**, v.37, p.1533-1541, 2001.
96. SUN, S.; SONG, Y.; ZHENG, Q. *Morphologies and properties of thermo-molded biodegradable plastics based on glycerol-plasticized wheat gluten*. **Food Hydrocolloids**, v.21, p.1005-1013, 2007.
97. TATHAM, A. S.; SHEWRY, P. R. *The S-poor prolamins of wheat, barley and rye*. **Journal of Cereal Science**, v.22, p.1-16, 1995.
98. BRUUN, S. W.; SONDERGAARD, I.; JACOBSEN, S. *Analysis of protein structures and interactions in complex food by near-infrared spectroscopy. I. Gluten powder*. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.55, p.7234-7243, 2007.
99. MIZUTANI, Y.; MATSUMURA, Y.; IMAMURA, K.; NAKANISHI, K.; MORI, T. *Effects of water activity and lipid addition on secondary structure of zein in powder systems*. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.51, p.229-235, 2003.
100. ZHANG, X.; DO, M. D.; DEAN, K.; HOOBIN, P.; BURGAR, I. M. *Wheat-gluten-based natural polymer nanoparticle composites*. **Biomacromolecules**, v.8, p.345-353, 2007.
101. BARRETO, P. L. M. *Propriedades físico-químicas de soluções formadoras e de filmes de caseinato de sódio plastificados com sorbitol*, **Tese de Doutorado**, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003, 100p.
102. ALMUTAWAH, A.; BARKER, S. A.; BELTON, P. S. *Hydration of gluten: a dielectric, calorimetric, and Fourier transform infrared study*. **Biomacromolecules**, v.8, p.1601-1606, 2007.
103. CAO, N.; FU, Y.; HE, J. *Preparation and physical properties of soy protein and gelatin composite films*. **Food Hydrocolloids**, v.21, p.1153-1162, 2007.
104. CHO, S. Y.; RHEE, C. *Mechanical properties and water vapor permeability of edible films made from fractionated soy proteins with ultrafiltration*. **Lebensm.-Wiss. u.-Technol.**, v.37, p.833-839, 2004.
105. TUNC, S.; ANGELLIER, H.; CAHYANA, Y.; CHALIER, P.; GONTARD, N.; GASTALDI, E. *Functional properties of wheat gluten/montmorillonite nanocomposite films processed by casting*. **Journal of Membrane Science**, v.289, p.159-168, 2007.

106. YANG, L.; PAULSON, A. T. *Mechanical and water vapour barrier properties of edible gellan films*. **Food Research International**, v.33, p.563-570, 2000.
107. SEBTI, I.; CHOLLET, E.; DEGRAEVE, P.; NOEL, C.; PEYROL, E. *Water sensitivity, antimicrobial, and physicochemical analyses of edible films based on HPMC and/or chitosan*. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.55, p.693-699, 2007.
108. TUNC, S.; DUMAN, O. *Thermodynamic properties and moisture adsorption isotherms of cottonseed protein isolate and different forms of cottonseed samples*. **Journal of Food Engineering**, v.81, p.133-143, 2007.